

# **Chemische Modifizierung von Dextran und Pullulan - Substitutionsmuster und Nanostrukturierung**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Kathrin Fiege  
aus Peine

1. Referentin:

2. Referent:

eingereicht am:

mündliche Prüfung (Disputation) am:

Professorin Dr. Petra Mischnick

Juniorprofessor Dr. Georg Garnweitner

17.10.2012

17.12.2012

Druckjahr 2013

# Vorveröffentlichungen der Dissertation

## Vorveröffentlichungen

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

## Publikationen

Vollmer, A.; Voiges, K.; Bork, C.; Fiege, K.; Cuber, K., Mischnick, P.  
Comprehensive analysis of the substitution pattern in dextran ethers with respect to the reaction conditions, *Anal. Bioanal. Chem.* 2009, **395**, 1749-1768.

Fiege, K.; Lünsdorf, H.; Atarijabarzadeh, S.; Mischnick, P. Cyanoethylation of the glucans dextran and pullulan: substitution pattern and formation of nanostructures and entrapment of magnetic nanoparticles, *Beilstein J. Org. Chem.* 2012, **8**, 551-556.

## Tagungsbeiträge

Fiege, K.; Lünsdorf, H.; Garnweitner, G. and Mischnick, P.: Cyanoalkyl glucans - synthesis, characterization and properties. (Vortrag) Zellcheming - Cellulose Symposium, 28. - 30.06.2011, Wiesbaden, Germany.

Mischnick, P.; Fiege, K.; Tahir, M. N.; Lünsdorf, H.: Nanostructures induced by cellulose and other glycan derivatives. (Vortrag) Zellcheming - Cellulose Symposium, 26. - 28.06.2012, Wiesbaden, Germany.

Fiege, K.; Lünsdorf, H.; Atarijabarzadeh, S.; Mischnick, P.: Cyanoethyl glucans: Formation of nanostructures and entrapment of magnetic nanoparticles. (Poster) 26th International Carbohydrate Symposium (ICS 2012), Madrid, 22 - 27 Juli, 2012.

# Danksagung

Hiermit möchte ich allen Menschen, die direkt oder indirekt an meiner Arbeit beteiligt waren, ein herzliches Dankeschön für ihre Unterstützung sagen.

Da wäre zunächst meine Mentorin Frau Prof. Dr. Petra Mischnick, der ich ganz besonders für ihre Förderung und auch Forderung danken möchte. Sie hatte immer Zeit zum Diskutieren und Entwickeln von neuen Ideen, egal in welchem Land sie sich gerade befand.

Meinem Koreferenten Herrn Prof. Dr. Georg Garnweitner vom Institut für Partikeltechnik danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens, für die Beratung in allen Fachfragen zu Nanopartikeln und für die Möglichkeit DLS-Messungen im Institut für Partikeltechnik durchführen zu können.

Herrn Prof. Dr. Stefan Schulz sei für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes gedankt.

Am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. Heinrich Lünsdorf, der mit unglaublicher Fachkompetenz Elektronenmikroskop-Experimente durchgeführt und erklärt hat. An Herrn Diplom Biologen Felix Deluweit geht ein großes Dankeschön für die Beratung bei DLS-Messungen und der Unterstützung bei graphischen Fragen. Christel Kakoschke möchte ich ganz herzlich für die Aufnahme von NMR-Spektren danken.

Nach Schweden zur KTH Stockholm geht mein Dank an Sevil Atarijabarzadeh für die Messung der SEM Proben.

Herrn Dr. Erik Heim, M. Sc. Aidin Lak, Dipl.-Ing. Thilo Wawrzik und Hilke Remmer vom Institut für Elektrische Messtechnik und Grundlagen der Elektrotechnik an der TU Braunschweig sei für die Messung der magnetischen Eigenschaften der Eisenoxid-Nanopartikel und den wissenschaftlichen Austausch gedankt.

Ein großes Dankeschön geht nach Jena an Herrn Prof. Dr. Thomas Heinze für die Hilfestellung zur Synthese von Eisen- und Polysaccharid-Nanopartikeln.

Herrn Dipl.-Ing. Denis Rosebrock vom Institut für Robotik der TU Braunschweig möchte ich für die Entwicklung eines Programms zur Größenbestimmung in elektronenmikroskopischen Aufnahmen ganz herzlich danken.



Meinem Diplomanden Hauke Zinow gilt ein herzlicher Dank für die anregenden Diskussionen über Nanopartikel.

Katja Cuber und Dana Lampe sei für den wissenschaftlichen Austausch gedankt.

Die Auszubildenden Janine Schlösser und Aline Probst haben mich bei der Laborarbeit sehr unterstützt und neue Sichtweisen mitgebracht. Vielen Dank euch!

In unserem Institut möchte ich besonders Frau LM-Chem. Marita Baum für die technische Unterstützung und Frau Balcke als Literaturexpertin danken.

Besonders wichtig waren für mich auch die Diskussionen mit meinen Mitdoktoranden - vielen Dank euch allen.

Ein ganz besonders großes Dankeschön gilt natürlich meinem Arbeitskreis (dem bisher besten der Welt) für die unglaublich große Hilfsbereitschaft in allen Dingen und die perfekte Arbeitsatmosphäre und natürlich an meine Laborhälfte Silke Lehmann.

Meinen Freunden, Frau Philipsen und Familie Kubernus möchte ich dafür danken, dass sie immer an mich geglaubt und mich unterstützt haben.

# **Chemische Modifizierung von Dextran und Pullulan - Substitutionsmuster und Nanostrukturierung**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Polysaccharide .....	1
1.1.1	Pullulan.....	2
1.1.2	Dextran.....	4
1.2	Derivatisierung von Polysacchariden .....	5
1.3	Charakterisierung von Glucanderivaten .....	9
1.4	Nanopartikel .....	15
<b>2</b>	<b>Ziel .....</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>Alkylglucane .....</b>	<b>22</b>
3.1	Grundlagen zur Alkylierung von Glucanen .....	22
3.1.1	Alkylierung mit Lithium-Dimsyl in DMSO .....	23
3.1.2	Alkylierung mit Natriumhydroxid in DMSO .....	24
3.1.3	Nebenreaktionen bei der Alkylierung von Polysacchariden.....	25
3.1.4	Synthese von Alkylglucanen .....	26
3.1.5	Alkylierung mit steigenden Mengen an Base und Alkylierungsmittel .....	27
3.1.6	Alkylierung mit unterschiedlicher Baseneinwirkzeit .....	39
3.1.7	Alkylierung mit NaOH in Wasser.....	40
<b>4</b>	<b>Cyanoethylglucane.....</b>	<b>44</b>
4.1	Cyanoethylierung von Polysacchariden .....	44
4.2	Charakterisierung von Cyanoethylglucanen.....	47
<b>5</b>	<b>Aminopropylglucane .....</b>	<b>63</b>
5.1	Aminofunktionalisierung von Glucanen .....	63
5.2	Charakterisierung von Aminopropylglucanen.....	69
<b>6</b>	<b>Modifizierung von Aminopropylglucanen mittels reduktiver Aminierung...76</b>	
6.1	Reduktive Aminierung von Polysacchariden .....	76
6.2	Charakterisierung von reduktiv aminierten Polysacchariden .....	81
6.2.1	<i>N</i> -Benzyl-aminopropyl-dextran.....	81
6.2.2	<i>N</i> -(4-Hydroxy-3-methoxy)benzyl-aminopropyl-dextran .....	84
6.2.3	<i>N</i> -3,5-Di- <i>tert</i> -butyl-4-hydroxy-benzyl-aminopropyl-dextran.....	90
6.2.4	Maltose und Maltotriose.....	92
<b>7</b>	<b>Nanostrukturierung .....</b>	<b>99</b>
7.1	Eisenoxid-Nanopartikel .....	99
7.1.1	Physikalische und chemische Eigenschaften.....	99
7.1.2	Möglichkeiten zur Synthese von Metalloxidnanopartikeln .....	101
7.1.3	Stabilisierung und Funktionalisierung von Eisenoxid-Nanopartikeln.....	104
7.2	Methoden zur Charakterisierung von Nanopartikeln .....	106
7.3	Synthese und Charakterisierung der Eisenoxid-Nanopartikel .....	116
7.4	Nanostrukturierung von modifizierten Polysacchariden.....	119

7.4.1	Nanostrukturierung von Cyanoethylglucanen .....	121
7.4.2	Nanostrukturierung von Aminopropyl-Cyanoethylglucanen .....	128
7.4.3	Nanopartikelbildung aus multifunktionalisierten Polysacchariden .....	131
7.4.4	Magnetpartikelspektroskopie .....	134
7.4.5	Markierung von Nanostrukturen mit Fluorescamine.....	137
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>141</b>
<b>9</b>	<b>Summary and Outlook .....</b>	<b>144</b>
<b>10</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>147</b>
10.1	Chemikalien .....	147
10.2	Geräte und Materialien .....	148
10.3	Synthesevorschriften.....	155
10.3.1	O-Alkylglucane .....	155
10.3.2	O-Cyanoethylglucane .....	156
10.3.3	O-Aminopropylglucane .....	158
10.3.4	Reduktive Aminierung .....	159
10.3.5	Nanostrukturierung.....	161
10.4	Derivatisierung von Glucanderivaten für die GC-Analytik .....	162
10.4.1	Hydrolyse mit Trifluoressigsäure .....	162
10.4.2	Reduktion.....	162
10.4.3	Acetylierung .....	163
10.4.4	Methanolyse.....	163
10.4.5	Trimethylsilylierung .....	163
10.4.6	Methyl- und Ethylglucane .....	164
10.4.7	Cyanoethylglucane.....	164
<b>11</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>165</b>
11.1	Substituentenverteilung von Alkyldextranen und -pullulanen .....	166
11.2	Substituentenverteilung von Ethyldextranen und -pullulanen .....	169
11.3	Substituentenverteilung von Cyanoethyldextranen und -pullulanen.....	170
<b>12</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>172</b>
<b>13</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>174</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Polysaccharide

Wie die Übersetzung des Begriffs aus den griechischen Wörtern „poly“ für viel und „saccharon“ für Zucker andeutet, handelt es sich bei Polysacchariden (PS) um Vielfachzucker, die aus einer Vielzahl von Monosacchariden zusammengesetzt sind. Als Glucane werden Polysaccharide bezeichnet, die aus Glucose (Glc) aufgebaut sind und glucosidische Bindungen aufweisen. Durch die Stereochemie am anomeren C-Atom, der Position der glucosidischen Verknüpfung und den Verzweigungsmöglichkeiten der polyfunktionellen Zuckerbausteine ergibt sich eine Vielzahl von Architekturen. Typ und Position der Verknüpfung bestimmen die Konformation der Kette und damit auch die makroskopischen Eigenschaften der Polysaccharide.

In der Natur sind Polysaccharide ubiquitär, sie dienen zur Strukturbildung (Cellulose, Chitin) oder als Energiespeicher (Stärke, Dextran, Glykogen). Zudem sind sie durch ihre wasserbindenden Eigenschaften wichtig als Schleimstoffe bei Pflanzen (Galactomannane, Pentosane) und Tieren (Mucopolysaccharide). Die Biomasse der jährlich von Pflanzen und Mikroorganismen hergestellten Kohlenhydrate beträgt ca.  $4 \times 10^{11}$  Tonnen.<sup>[1]</sup>

Die Verwendung von Polysacchariden ist ähnlich vielfältig wie ihre Struktur. In der Ernährung sind sie wichtig als Energielieferanten und Ballaststoffe. In der Lebensmittelbranche dienen sie z.B. der Stabilisierung von Proteinschäumen (Schlagrahm, Schaumküsse, Bier), zur Wasserbindung und Konsistenzgebung (Käse, Pudding, Konfitüre, etc.) sowie zur Verkapselung von Aromastoffen.<sup>[2]</sup>

In der Pharmaindustrie ist der Einsatz von Polysacchariden, z.B. als Tablettiermittel oder zur Nanoverkapselung zur Bindung und zum Transport sowie zur Freisetzung von Arzneiwirkstoffen (Drug delivery system bzw. Controlled release) ein typisches Anwendungsfeld.<sup>[1-4]</sup>

Cellulose und Stärke sind aufgrund ihres großen Vorkommens und ihrer wirtschaftlichen Bedeutung sehr gut erforscht. Pullulanen und Dextranen ist, bedingt durch ihr geringeres Handelsvolumen und den höheren Preis, weniger Aufmerksamkeit gewidmet worden. In den letzten Jahren wurde jedoch ihre Bedeutung für Spezialanwendungen in biochemischen oder pharmazeutischen Bereichen (z.B. Wirkstofftransport) oder in Biosensoren immer wichtiger.<sup>[4-10]</sup> Relativ neu ist die Nutzung von Pullulan und Dextranen bzw. ihren Derivaten zur Nanostrukturierung. Diese Polysaccharide und ihre Derivate können zur Mikro- oder Nanoverkapselung von Medikamenten, Vitaminen oder in der

Magnetresonanztomographie eingesetzt werden.<sup>[11-14]</sup> Aufgrund dieses Potentials wurden Dextran und Pullulan als Substrate für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ausgewählt. Zudem repräsentiert Dextran ein verzweigtes Polysaccharid und Pullulan ein linear gebautes. Im Folgenden werden diese beiden Polymere vorgestellt.

### 1.1.1 Pullulan

Pullulan ist ein Homopolysaccharid aus D-Glucopyranosyleinheiten. Die Glucosebausteine liegen als  $\alpha$ -1,6-verknüpfte Maltotrioseeinheiten im linearen Makromolekül vor (siehe Abb. 1.1). Makroskopisch handelt es sich um eine farb- und geruchslose Substanz, die zumeist in Pulverform vorliegt und sehr gut wasserlöslich ist. Pullulan hat filmbildende Eigenschaften und ist essbar. Durch die Enzyme unseres Verdauungstraktes wird es nicht gespalten und daher unverdaut wieder ausgeschieden. Die Synthese des Polysaccharids erfolgt u.a. durch den Mikroorganismus *Aureobasidium pullulans*.<sup>[15]</sup> Bei dieser hefeähnlichen Pilzart handelt es sich um einen Saprophyten, also einen Fäulnisbewohner, der seine Nährstoffe aus verrottender Biomasse bezieht und ubiquitär vorkommt. Marsh und Bollenbacher untersuchten 1949 seine Rolle beim Verrotten von Militärausstattung in tropischen Regionen.<sup>[16]</sup> Über die Biosynthese von Pullulan ist bisher wenig bekannt.<sup>[15]</sup>

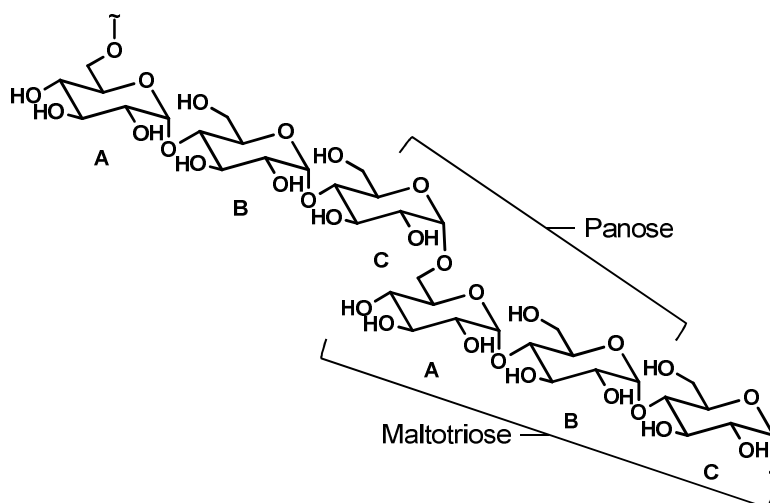


Abb. 1.1: Ausschnitt aus einem Pullulanmolekül.

Die Isolierung und eine erste Charakterisierung wurden durch Bernier im Jahr 1958 vorgestellt.<sup>[17]</sup> Die Namensgebung erfolgte ein Jahr später durch Bender et. al., die neben Studien zu den Aufzuchtbedingungen des Pilzes eine genaue Charakterisierung von Pullulan durchführten.<sup>[18]</sup> Mittels IR-Spektroskopie, Methylierungsanalysen und Periodatspaltung konnte die Grundstruktur aufgeklärt werden.<sup>[19,20]</sup> Das Enzym Pullulanase, welches das Polysaccharid durch spezifische Hydrolyse der  $\alpha$ -1,6-Verknüpfung in Maltotrioseeinheiten spaltet, wurde ebenfalls klassifiziert.<sup>[21]</sup> Fünf Jahre nach Entdeckung der Maltotriosebasiseinheiten gelang Catley und seinen Mitarbeitern der Nachweis von

geringen Anteilen zufällig verteilter Maltotetraoseuntereinheiten (Anteil 1-7 %).<sup>[22]</sup> Im Jahr 2000 konnten im Pullulan des Stammes CH-1 von *Aureobasidium pullulans* nach Methylierungsanalyse 1,4- und 1,6-Verknüpfungen im Verhältnis von 1,8 : 1 bzw. 2,3,4- und 2,3,6-Tri-*O*-methylglucose in Anteilen von 32 % und 67 % nachgewiesen werden. Nach partieller Hydrolyse wurden Glucose, Maltose ( $\alpha$ -1,4), Maltotriose ( $\alpha$ -1,4 -  $\alpha$ -1,4), Panose ( $\alpha$ -1,6 -  $\alpha$ -1,4) und Isopanose ( $\alpha$ -1,4 -  $\alpha$ -1,6) identifiziert.<sup>[23]</sup> Tatsächlich erfolgt die industrielle Synthese von Panose mittels immobilisierter Neopullulanase.<sup>[24,25]</sup>

Im Jahr 1976 begann die kommerzielle Produktion von Pullulan durch die Hayashibara Company in Okayama, Japan. Die Produktion erfolgt chargenweise mittels Fermentation. Stärke, Saccharose, Glucose, Fructose, Maltose, Mannose, Xylose oder Arabinose dienen als Kohlenstoff-Quelle.<sup>[26,27]</sup>

Pullulan wird durch Fällung mit organischen Lösungsmitteln, zumeist Alkoholen, gereinigt. Als weitere Schritte können sich Ultrafiltration und Ionenaustausch zur Entfärbung durch Abtrennung von Melaninen anschließen. Diese Pigmente entstehen bei der Synthese von Pullulan als Nebenprodukt und ihre Entfernung ist ein Schwerpunkt bei der Reinigung. Daneben ist die Viskositätserhöhung während der Produktbildung eines der Hauptprobleme der Prozessführung. In letzter Zeit konnten sogenannte „Feed-batch“ (Zulauf) Prozesse sowie kontinuierliche Prozesse verwirklicht werden.<sup>[28]</sup>

Das jährliche Produktionsvolumen liegt nach einer Studie des Fraunhofer-Instituts (Überblick über den Stand von Wissenschaft und Technik im produktionsintegrierten Umweltschutz durch Biotechnologie vom Dezember 2002 für die Anwendung im Lebensmittelbereich) bei 10.000 t/a.<sup>[29]</sup>

Pullulan ist im Vergleich zur unlöslichen Amylose, zu der es sich nur durch die  $\alpha$ -1,6-Verknüpfungen jeder dritten Glucosyleinheit unterscheidet, sehr gut wasserlöslich. Durch die Verknüpfung über Position 6 liegt im Gegensatz zu Amylose eine weitere Einfachbindung und damit eine weitere Möglichkeit zur Rotation vor, was eine höhere Flexibilität und somit Löslichkeit bedingt. Hieraus resultiert auch die Fähigkeit zur Bildung von Filmen und Fasern, die vor allem im Lebensmittelsektor und zur Umhüllung von Arzneimitteln genutzt wird. Pullulanfilme werden zumeist durch Trocknung der Polysaccharidlösung (5-10%ig) gewonnen. Die Schichtdicke liegt zwischen 5 und 60  $\mu\text{m}$ . Die Filme besitzen ausgezeichnete mechanische Eigenschaften und sind zudem transparent und luftundurchlässig.<sup>[30-32]</sup>

Die optische Wirkung tritt vor allem bei Lebensmitteln in den Vordergrund, da Pullulanfilme auf vielfältige Art und Weise mit Lebensmittelfarbe bedruckt oder eingefärbt werden können. Ein Beispiel sind bunte, aromatisierte Pullulanfilme, die als Atemersfrischer kommerziell erhältlich sind. Mit Cellophan oder Polypropylen bildet Pullulan

Fasern hoher Festigkeit. Zudem werden die adhäsiven Eigenschaften dieses Polysaccharids in vielfältigen Anwendungen, wie z.B. in Gebisskleber, zum Verschließen von Briefumschlägen, als Bindemittel für Tabak oder auch als Zusatz in Pflanzendünger genutzt. Des Weiteren sind durch die Modifizierung von Pullulan Anwendungen in der Lithographie oder Elektrotechnik sowie auf dem pharmazeutischen Sektor bereits realisiert.<sup>[32,33]</sup> Vergleichsweise neu ist die Applikation von hydrophob modifiziertem Pullulan in Form von Hydrogelnanopartikeln z.B. zum Wirkstofftransport von Krebsmedikamenten oder in der Gentherapie.<sup>[4,10,34,35]</sup>

### 1.1.2 Dextran

Der Name Dextran wurde 1874 von Scheibler eingeführt, der zunächst die elementare Zusammensetzung mit  $(C_6H_{10}O_5)_n$  und mit dem von ihm entwickelten Polarimeter (Soleil-Scheiblersches-Polarimeter), den Drehwert von  $[\alpha]_D = 195-201^\circ$  (in  $H_2O$ ) bestimmte.<sup>[36]</sup>

Heute ist bekannt, dass Dextran aus  $\alpha$ -1,6-verknüpften Glucopyranosyleinheiten in der Hauptkette besteht. Abhängig von der Molmasse und den Synthesebedingungen können  $\alpha$ -1,2,  $\alpha$ -1,3 und  $\alpha$ -1,4-verknüpfte, kurze Seitenketten (zumeist 1-2 Glucoseeinheiten) vorliegen. In Abb. 1.2 ist ein Strukturausschnitt eines Dextranmoleküls mit  $\alpha$ -1,3-Verzweigung gezeigt. Bei dem wirtschaftlich wichtigsten Dextran NRRL B-512F (*Leuconostoc mesenteroides*) liegen ca. 5 % 3-O-Verzweigung vor, die zu 85 % aus einem oder zwei Glucosebausteinen in den Seitenketten bestehen. Die Überstruktur wird durch 1-2 % „Long chain branching“ (Verzweigungen der Hauptketten durch Transfer eines Stranges auf den anderen) beeinflusst. Die genaue Struktur ist vom jeweiligen, synthetisierenden Bakterienstamm (z.B. *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptobacterium dextranicum*, *Streptococcus mutans*) abhängig.<sup>[37-39]</sup>

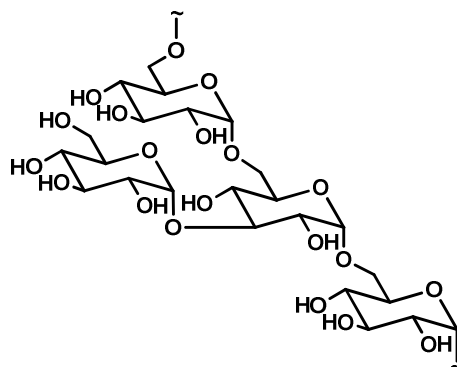


Abb. 1.2: Ausschnitt aus einem Dextranmolekül mit 1,3-Verzweigung.

Die industrielle Produktion erfolgt aus Saccharose im Batchverfahren. Die physiologische Funktion von Dextranen für die Mikroorganismen ist noch nicht vollständig geklärt. Die Exopolysaccharide werden von den Bakterien nicht verstoffwechselt, sie dienen daher



nicht als Speichermaterial. Das Polysaccharid fungiert als Zellschutz vor Austrocknung und als Hilfsmittel zum Anheften (Biofilmbildung) an umgebende Substrate. Verwendet werden Dextrane und -derivate aufgrund ihres im Vergleich zu Cellulose oder Stärke, relativ höheren Preises (ca. 20 Euro/kg) zumeist als Spezialchemikalien im pharmazeutischen und wissenschaftlichen Bereich.<sup>[40,41]</sup> Lange bekannt ist die Nutzung des Glucans als Plasmaexpander. Dextrane mit  $M_w$  40.000, 60.000 oder 70.000 g/mol werden in 6 - 10%igen Lösungen als Ersatz bei moderatem Blutverlust eingesetzt. Aufgrund ihrer kryoprotektorischen Wirkung werden Dextrane zur Konservierung von Blutkonserven eingesetzt.<sup>[42]</sup> Lebensmitteln, wie Backwaren, Süßigkeiten oder Getränken werden Dextrane aufgrund ihrer verdickenden und stabilisierenden Wirkung zugegeben.<sup>[2]</sup> Quervernetzte Dextrane finden labortechnische Anwendung als Trennphase in chromatographischen Prozessen (Größenaustauschchromatographie oder Affinitätschromatographie) und sind unter dem Handelsnamen Sephadex® (GE Healthcare Uppsala, früher Pharmacia) bekannt.

Eine neue Entwicklung stellt die Synthese von Nanopartikeln auf Dextranbasis dar, wie in Kapitel 7 noch detailliert erläutert wird.<sup>[43,44]</sup>

## 1.2 Derivatisierung von Polysacchariden

Bisher sind nur die Eigenschaften von natürlich vorkommenden Polysacchariden kurz beschrieben worden. Nach chemischer Derivatisierung sind die Anwendungsmöglichkeiten von Glucanen deutlich erweitert. Neue Funktionalitäten können eingeführt und die Eigenschaften des Makromoleküls damit verändert werden. Es können hydrophile, hydrophobe, amphiphile, neutrale oder geladene Derivate dargestellt werden. Die Kombination von verschiedenen Reaktionen zur Erzeugung von bifunktionalisierten Derivaten ist ebenfalls möglich. In Abb. 1.3 ist eine Auswahl von Derivatisierungen von Polysacchariden dargestellt.<sup>[45]</sup>

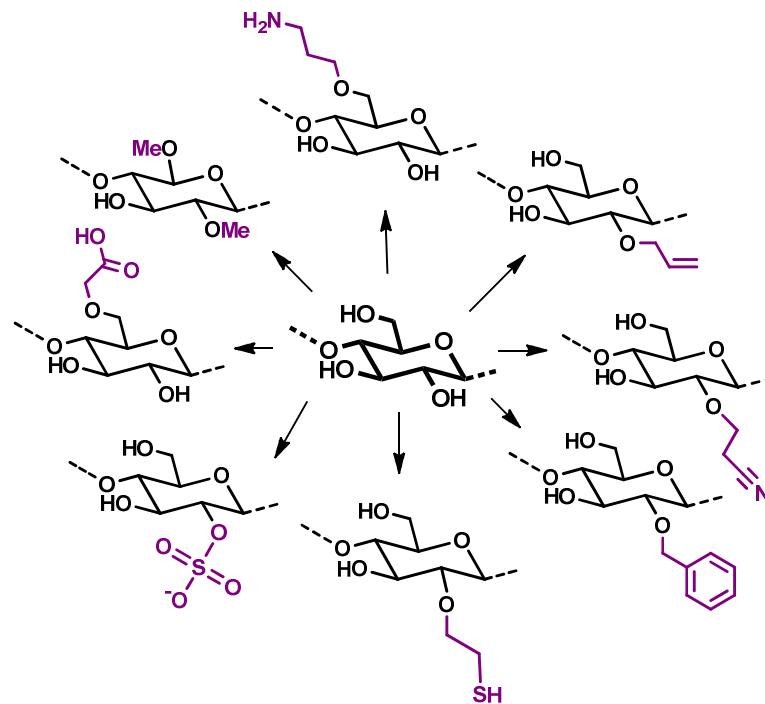


Abb. 1.3: Verschiedene Derivate von Polysacchariden, hier am Beispiel von 1,4-Glucanen.

Die in dieser Arbeit relevanten Reaktionen (Alkylierung, Cyanoethylierung, Aminofunktionalisierung) werden in den entsprechenden Kapiteln des Hauptteils vorgestellt.

Die Veretherung von Polysacchariden ist die wichtigste Derivatisierung. Insbesondere die Methylierung von Cellulose und Stärke wurde aufgrund der industriellen Bedeutung dieser beiden Polysaccharide und ihrer Ether hinsichtlich des Einflusses der Reaktionsbedingungen und der Regioselektivität der Substitution innerhalb der Glucoseeinheit bis zur Polymerebene untersucht.<sup>[46]</sup> Die Permethylierung nach Hakomori mit Na-Dimsyl/Mel in DMSO brachte 1964 den erfolgreichen Durchbruch für die Analyse von Verknüpfungen mittels „Methylierungsanalyse“.<sup>[47]</sup>

Für andere Polysaccharidderivate als Stärke und Cellulose ist weniger über die Substituentenverteilung bekannt. Für Dextran- und Pullulanderivate wird zumeist nur der durchschnittliche Substitutionsgrad mittels NMR-Spektroskopie oder Elementaranalyse bestimmt. Die Substituentenverteilung (auf Monomerebene) ist aber von großer Bedeutung, da sie Auswirkungen auf das ganze Makromolekül hat und die Eigenschaften maßgeblich beeinflussen kann.<sup>[48-50]</sup>

Die Methylierung von Dextran und Pullulan wird in dieser Arbeit als erste Modellreaktion ausgewählt, da die Analyse von Methylethern für Cellulose- und Stärkederivate etabliert ist. Methylether sind zudem säure- und alkalistabil und es handelt sich um den kleinsten und einfachsten organischen Substituenten.

## Aminofunktionalisierung von Polysacchariden

Aminofunktionen sind wichtige reaktive Gruppen. Unter den Polysacchariden ist Chitin der bekannteste Vertreter der Aminoglucane und ist nach Cellulose das zweithäufigste Biopolymer auf der Erde. Es handelt es sich um ein Homopolysaccharid aus *N*-Acetyl-D-glucosaminen, die wie in Cellulose  $\beta$ -1,4-verknüpft vorliegen. Chitin ist Bestandteil des Exoskeletts von Insekten, spielt beim Zellwandaufbau von Algen, Pilzen oder Flechten eine Rolle und kommt in den Skleroproteinen von Mollusken vor. Die strukturgebende Funktion dieses Polysaccharids ist auf die Acetamidogruppe in Position 2 und die damit vorhandene Möglichkeit zur Ausbildung starker Wasserstoffbrückenbindungen zurückzuführen. Liegt Chitin zu mehr als 40 - 50 % deacetyliert vor, wird die Verbindung als Chitosan bezeichnet. Die industrielle Herstellung erfolgt durch alkalische oder enzymatische Deacetylierung von Chitin aus Krabbenschalen. Der Anwendungsbereich ist vielfältig. Chitosan wird beispielsweise als Additiv in kosmetischen Produkten, zur Wundabdeckung, zur Komplexierung von Schwermetallen oder als Kompostierhilfe eingesetzt.<sup>[51]</sup> Ein weiterer wichtiger Vertreter der Aminoglucane ist Heparin, das aus Wiederholungseinheiten von  $\alpha$ -1,4-verknüpften D-Glucosamin und Uronsäureeinheiten besteht. Dieses Glucan kann aus Mastzellen von Tieren isoliert werden. Als Antikoagulanzen verhindert es die Blutgerinnung im Körper und wird bei thromboembolischen Erkrankungen als gerinnungshemmendes Mittel eingesetzt.<sup>[52]</sup>

Die Aminofunktionalisierung von Polysacchariden ermöglicht deren Einsatz auf vielen Gebieten wie z.B. in Microarrays, im medizinischen Bereich und in der analytischen Chemie. Zur Herstellung von Microarrays werden oft Oligo- oder Polysaccharide als Komponenten eingesetzt. Zur Kopplung von Kohlenhydraten oder ihrer Funktionalisierung ist die reduktive Aminierung ein probates Mittel. So können beispielsweise Oligosaccharide für sogenannte Glucanarrays immobilisiert und zur Analyse von Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen eingesetzt werden.<sup>[53]</sup> Auch Aminoethylglucane wurden als Komponenten für den Einsatz in Glucanarrays untersucht.<sup>[54]</sup> In Biosensoren wurden filmbildende Aminocellulosederivate mit aromatischen Diamin-Endgruppen eingesetzt, indem sie als Kopplungsstelle für Oxidoreduktasen dienen.<sup>[55]</sup> Aminopropylamylose konnte erfolgreich zur Stabilisierung des Enzyms Horseradish Peroxidase gegen Hitzedeaktivierung und pH-Wert-Einflüsse verwendet werden, indem das Enzym durch Addition und Cross-linking in die Glucanmatrix eingebracht wurde.<sup>[56]</sup> Im medizinischen Bereich können aminofunktionalisierte Glucane zum Wirkstofftransport bzw. zur Freisetzung (Drug delivery) eingesetzt werden. Mann et al. beschreiben die Realisierung eines solchen Systems auf Grundlage eines aminofunktionalisierten Dextrans. Ein pH-aktives *N*-cis-Aconityl-Derivat des Krebsmedikaments Daunomycin konnte gebunden und mit gezielter Einstellung auf einen pH-Wert von 4 (Citrat-Boratpuffer) wieder freigesetzt werden.<sup>[57]</sup> Aminopropylamylosen wurden erfolgreich zur Herstellung von nichtad-

hesiven Hydrogelbeschichtungen auf Biomaterialoberflächen getestet. Als potentielle Anwendung wird die Beschichtung von Implantaten beschrieben.<sup>[58]</sup> In anderen Arbeiten wurden Polyethylenimine mittels reduktiver Aminierung mit Maltose, Maltotriose und Maltoheptaose gekoppelt und ihre Eignung als DNA/siRNA Transporter getestet.<sup>[59]</sup> In der analytischen Chemie wird die Aminofunktionalisierung z.B. zur Erhöhung der Ionisierungseffizienz von ESI-MS-Messungen eingesetzt. So konnte die massenspektroskopische Detektion von Oligomeren durch den Einsatz von 1,6-Hexamethyldiamin als Label entscheidend verbessert werden.<sup>[60]</sup> Die Eigenschaften von *O*-(Aminoethyl)inulin als Radikalfänger wurde ebenfalls untersucht. Modifiziertes Inulin zeigt moderate Hydroxylradikal- und Superoxidradikal-abfangende Eigenschaften.<sup>[61]</sup> Für Aminopropylcellulosen ist der Einsatz als Adsorbens für Schwermetallionen beschrieben.<sup>[62]</sup>

Als Vorstufe für die Synthese von Aminoglucanen können Cyanoethylglucane eingesetzt werden. Durch Reduktion können die Cyanoethylgruppen in Aminofunktionen überführt werden, wie es Verraest für Inulin beschrieben hat.<sup>[63,64]</sup> Cyanoethylglucane sind aber nicht nur als Vorstufe interessant, sondern auch ihre Leitfähigkeit führte zu einer Reihe von bemerkenswerten Anwendungen. Cyanoethylierte Pullulane wurden aufgrund ihrer guten filmbildenden Eigenschaften in Biopolymerbatterien getestet. So wurde schon vor 30 Jahren das Potential von Cyanoethylpullulanen als Segment in elektronischen Bauteilen patentiert.<sup>[65]</sup> Yoshida und Mitarbeiter zeigten die Anwendung als Matrixpolymer mit guten Gelbildungseigenschaften, elektrochemischer Stabilität und Ionenleitfähigkeit in Gelelektrolyten. Die praktische Umsetzung dieser Arbeit ist eine Lithiumionenpolymerbatterie, die eine hohe Ladungs- bzw. Entladungskapazität aufweist.<sup>[66]</sup> Ein vertikaler elektrochemischer Transistor basierend auf Poly(3-hexylthiophen) und den filmbildenden Eigenschaften von Cyanoethylpullulan konnte durch Taniguchi und Kawai realisiert werden.<sup>[33]</sup> Die Aktualität von elektroaktiven Biopolymeren in Einsatzgebieten wie Biosensoren, künstlichen Muskeln und visuellen Displays wird durch Finkenstadt zusammengefasst. Dort werden elektroaktive Polymere (EPAs) als neue Materialklasse beschrieben und Terminologie sowie physikalische Grundlagen werden definiert. EPAs lassen sich, abhängig von der Art des Elektronentransports, in zwei Klassen einteilen: die Polymerelektrolyten (Ionenleitung) und die leitenden Polymere (Elektronenleitung über  $\pi$ -Elektronen).<sup>[67]</sup>

Nach Reduktion der Cyanoethylglucane können die entstandenen Aminogruppen für weitere Modifikationen genutzt werden. Mittels reduktiver Aminierung kann die Kopplung von Aldehyden an aminofunktionalisierte Polysaccharide erreicht werden. Auf diese Weise können neue Eigenschaften, wie UV-Aktivität oder Fluoreszenz, aber auch Kohlenhydratseitenketten in das Polymermolekül eingebracht sowie das Löslichkeitsverhalten verändert werden. Werden filmbildende Polysaccharide, wie z.B. Pullulan benutzt, könnten Antioxidantien in diesen Filmen fixiert und als konservierende Schichten in der

Lebensmittel- oder Kosmetikindustrie eingesetzt werden. Durch die kovalente Anbindung der Wirkstoffe könnte so eine unkontrollierte Freisetzung in die Umwelt vermieden werden. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit der Abtrennung (aus Lebensmittelmatrices) nach Anwendung. Ein Beispiel dafür Trägermaterialien aus Polyallylamin oder Polystyrol, die mit 3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzaldehyd oder *tert*-Butylhydrochinon funktionalisiert wurden und in Lebensmittelölen eingesetzt und wieder entfernt werden können.<sup>[68]</sup> In einer anderen Untersuchung zur Anwendung in Lebensmittelverpackungen wurden Vanillin und 4-Hydroxybenzaldehyd an Chitosan gebunden und die physiko-chemischen Barriereigenschaften sowie die antimikrobielle Aktivität getestet.<sup>[69]</sup>

### 1.3 Charakterisierung von Glucanderivaten

In diesem Abschnitt werden die wichtigsten Methoden zur strukturellen Charakterisierung und zur Bestimmung der Substituentenverteilung in Monomereinheiten von Glucanderivaten vorgestellt. Der Inhalt dieses Kapitels stützt sich auf einen Übersichtsartikel von Mischnick und Momcilovic über die chemischen Strukturanalyse von Stärke- und Cellulosederivaten.<sup>[48]</sup> Zunächst erfolgt die Definition des mittleren Substitutionsgrads. Durch den DS-Wert (DS, Degree of Substitution) wird die durchschnittliche Anzahl an substituierten Hydroxylgruppen pro Anhydroglucose-Einheit (AGU) definiert (Gleichung 1.1). Er ist damit ein Wert für das Ausmaß der Substitution der Hydroxylgruppen und kann bei Glucanen aus Hexosen Werte von 0 bis 3 annehmen. Eine Tetrasubstitution ( $c_4$ ) tritt vor allem bei verzweigten Polysacchariden (terminale Einheiten) auf und ist hier der Vollständigkeit halber angegeben.

$$DS = \frac{\text{mittlere Anzahl derivatisierter OH – Gruppen}}{AGU} \quad (1.1)$$

$$= (4c_4 + 3c_3 + 2c_2 + c_1)$$

mit:

$$\begin{aligned} c_0 &= s_0 \\ c_1 &= s_2 + s_3 + s_4 + s_6 \\ c_2 &= s_{23} + s_{24} + s_{34} + s_{26} + s_{36} + s_{46} \\ c_3 &= s_{234} + s_{236} + s_{346} + s_{246} \\ c_4 &= s_{2346} \end{aligned} \quad (1.2)$$

Das Element  $s_i$  steht für die Molenbrüche der Glucosyleinheiten und  $c_i$  für die Molfraktionen, die  $i$ -fach substituiert sind. Damit ergibt sich:

$$\sum s_i = 1.$$

Der Gesamt-DS-Wert kann auch als Summe von partiellen DS-Werten ( $x_i$ ) dargestellt werden:

$$DS = \sum x_i \quad (1.3)$$

mit:

$$\begin{aligned} x_2 &= s_2 + s_{23} + s_{24} + s_{26} + s_{234} + s_{236} + s_{246} + s_{2346} \\ x_3 &= s_3 + s_{23} + s_{34} + s_{36} + s_{234} + s_{236} + s_{346} + s_{2346} \\ x_4 &= s_4 + s_{24} + s_{34} + s_{46} + s_{234} + s_{346} + s_{246} + s_{2346} \\ x_6 &= s_6 + s_{26} + s_{36} + s_{46} + s_{236} + s_{346} + s_{246} + s_{2346} \end{aligned} \quad (1.4)$$

## IR-Spektroskopie

Mittels IR-Spektroskopie können funktionelle Gruppen identifiziert werden. Durch Abschätzung der Intensität der Schwingungen sind semiquantitative Aussagen möglich. Somit stellt diese Methode eine gute und sehr schnelle Möglichkeit dar, den Erfolg und das Ausmaß von Modifizierungen an Polysacchariden zu verfolgen.

In Abb. 1.4 sind die IR-Spektren von MethylDEXTRANEN mit ansteigendem DS-Werten von 0,25 (c) bis 2,91 (a) gezeigt. Zum Vergleich sind ein natives Dextran (d, 70 kDa) und Pullulan (e, 100 kDa) dargestellt. Die Intensität der OH-Schwingung um  $3340 \text{ cm}^{-1}$  nimmt mit zunehmenden Methylierungsgrad ab und ihr Maximum ist im Vergleich zum nativen Dextran zu höheren Wellenzahlen verschoben (Abb. 1.4 a bis c). Die C-H-Schwingungen ( $2919 - 2889 \text{ cm}^{-1}$ ) sind nach der Substitution mit Methylgruppen ebenfalls ausgeprägter und die Banden der  $\text{CH}_3$ -Gruppe kommen neu hinzu.

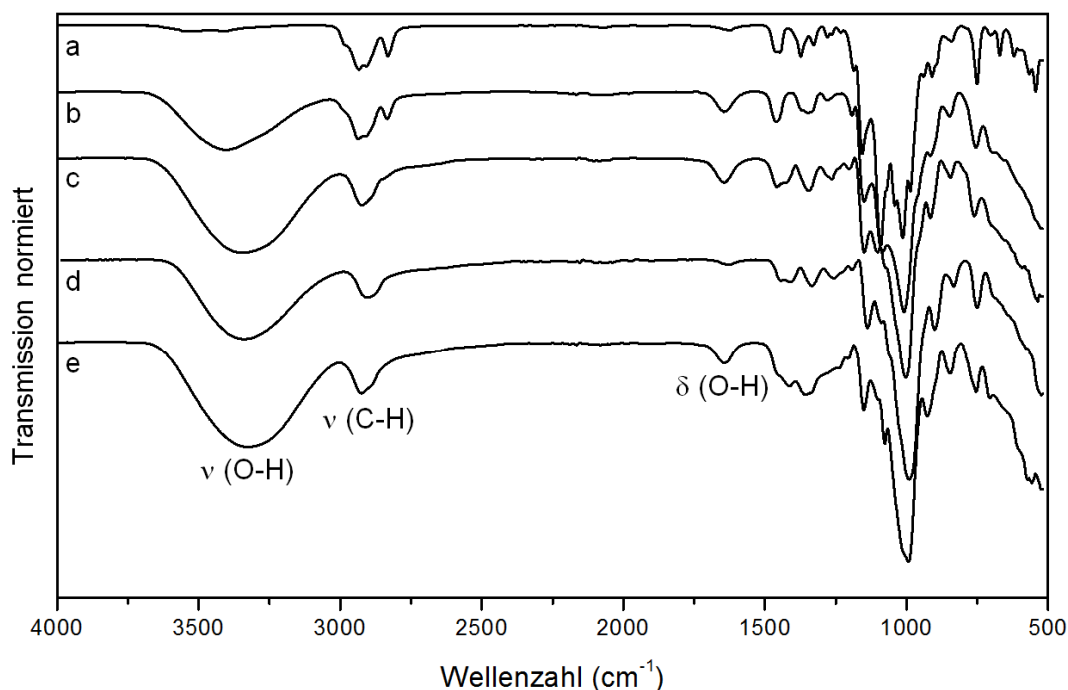


Abb. 1.4: ATR-IR-Spektren von Methyldextranen (a) D-33,  $DS_{Me} = 2,91$ , (b) D-2,  $DS_{Me} = 1,62$ , (c) D-18-1,  $DS_{Me} = 0,25$ , im Vergleich mit den nativen Glucanen (d) Dextran (70 kDa) und (e) Pullulan (100 kDa). Reaktionsbedingungen siehe Kapitel 3.

## NMR-Spektroskopie

Die Bestimmung des Substitutionsgrades mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie ist ein weit verbreitetes und vor allem relativ schnelles Verfahren, da auf eine Depolymerisation und weitere Probenpräparation zumeist verzichtet werden kann. Durch den Vergleich von ausgewählten, frei liegenden Substituentensignalen mit den vom Zucker stammenden Protonen (zumeist  $H-1$ ) kann das Ausmaß der Substitution ermittelt werden. Da die Substitution an O-2 eine Tieffeldverschiebung des Protons  $H-1$  bewirkt, kann meist auch  $x_2$  berechnet werden. Durch einen partiellen Abbau des Polysaccharids mittels Säure, Ultraschall oder Enzymeinwirkung wird die Löslichkeit in vielen Fällen verbessert und die Viskosität gesenkt, sodass Spektren mit besserer Auflösung erhalten werden.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren sind weniger komplex, haben aber den Nachteil der geringeren Empfindlichkeit.

Durch zweidimensionale NMR-Techniken können homo- und heteronukleare Kopplungen innerhalb von Molekülen bestimmt werden. Mittels TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) können die Kopplungen aller Protonen in einem Spinsystem bestimmt werden, während H,H-COSY-Analysen Kopplungen über zwei bis drei Bindungen zeigen. Die aus HMQC-Spektren (Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence) gewonnenen Kreuzsignale geben Auskunft über heteronukleare, skalare Kopplungen. Aus den Kreuzsignalen von HMBC-Experimenten (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) können heteronukleare Kopplungen von zwei bis vier Bindungen ermittelt werden.<sup>[70]</sup>

## Elementaranalyse

Mittels Elementaranalyse (EA) werden die Gewichtsanteile (Gew.%) einzelner chemischer Elemente in chemischen Verbindungen bestimmt. Sind Heteroatome, wie N, Si, S, P oder Halogene im Substituenten enthalten, kann darüber eine Berechnung des mittleren Substitutionsgrades erfolgen. Fehlen diese, kann das Ausmaß der Substitution ggf. über das C/H-Verhältnis abgeschätzt werden (z.B. Alkinylether). Durch Feuchtigkeit und stark adsorbierende oder eingeschlossene Verunreinigungen können die Ergebnisse der Elementaranalyse sehr leicht verfälscht werden. Daher ist es erforderlich auch die C/H- bzw. C/N-Verhältnisse mit theoretisch berechneten Werten zu vergleichen.

Je nach Art des Substituenten können spezifische Bestimmungsmethoden durchgeführt werden. Bei Carboxymethylcellulosen ist die Bestimmung des durchschnittlichen Substitutionsgrades mittels acidometrischer Titration möglich. Sind die Substituenten UV-aktiv oder fluoreszieren sie, können sie mit den geeigneten spektroskopischen Methoden erfasst werden. Weitere allgemeine Methoden, die zur Bestimmung eingesetzt werden können, sind nach entsprechender Probenpräparation HPLC oder Kapillarelektrophorese.

## Bestimmung von DS-Wert und Substitutionsmuster mittels Gaschromatographie

Um eine analytische Methode zu haben, die über den durchschnittlichen DS-Wert hinausgeht, wurde in der vorliegenden Arbeit die Substituentenverteilung mittels gaschromatographischer Analyse (GC) bestimmt. So können sowohl Aussagen über den Substitutionsgrad als auch über das Substitutionsmuster auf Monomerebene gemacht werden.

Für die gaschromatographische Analyse ist eine Überführung der Glucanderivate in leicht flüchtige Verbindungen notwendig. Hierbei dürfen das Substitutionsmuster und die relative Zusammensetzung der Probe nicht verändert werden. Zur Depolymerisation können saure Hydrolyse oder Methanolyse eingesetzt werden. In Abb. 1.5 sind Möglichkeiten zur weiteren Derivatisierung der Hydrolyse- bzw. Methanolyseprodukte von Methylglucanen dargestellt. Der Depolymerisation mit Säure folgt die Reduktion mit  $\text{NaBH}_4$  mit anschließender Acetylierung. Nach Methanolyse folgt die Trimethylsilylierung mit *N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) zu  $\alpha,\beta$ -Methyl-*O*-trimethylsilyl-glucosiden.

Diese beiden Verfahren werden im Folgenden mit HRA für Alditolacetate und mit Meglc/OTMS für silylierte Derivate bezeichnet. Die Zuordnung der resultierenden Peaks erfolgte mittels GC-MS-Analytik.



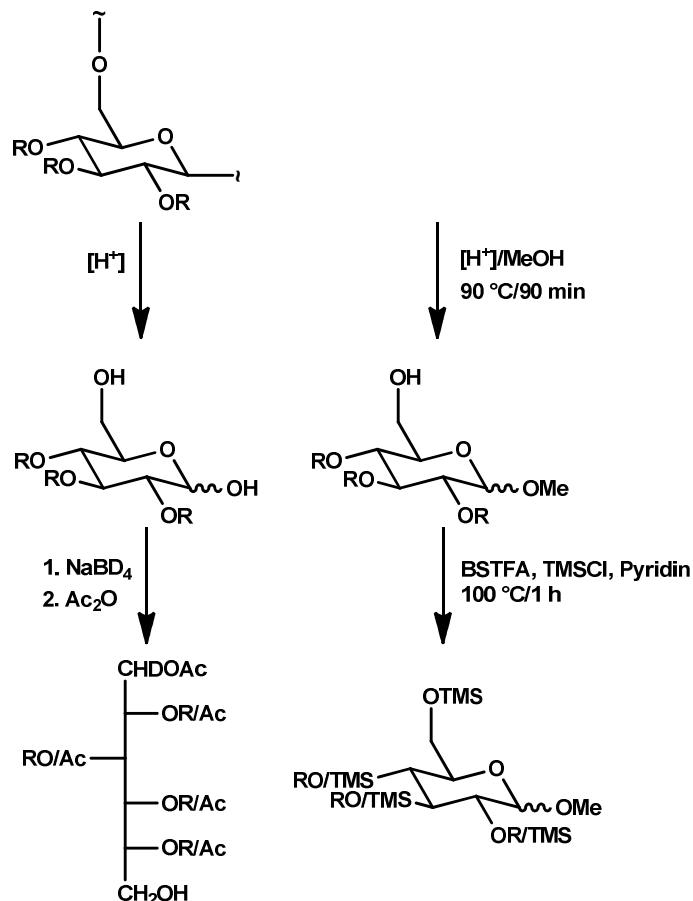


Abb. 1.5: Depolymerisation und Derivatisierung von O-Alkylglucanen für GLC-FID- und GC-MS-Messungen.

Zur Quantifizierung wurde ein Flammenionisationsdetektor (FID) eingesetzt. Bei diesem massenstromabhängigen Detektor ist die Intensität der Anzeige von der Anzahl der Kohlenstoffatome in der Substanz sowie deren chemischer Umgebung abhängig. Je höher die Elektronendichte am Kohlenstoffatom, desto intensiver ist das vom FID registrierte Signal. Sind elektronenziehende Substituenten in der Nähe, vermindern sie die Signalintensität und damit die Peakfläche. Durch Anwendung des Effective Carbon Response Konzeptes (ECR) gemäß Sweet (und nachfolgenden Arbeiten) können diese Diskriminierungen bei der Ionisierung korrigiert werden.<sup>[71-73]</sup> Bei diesem Ansatz werden die Inkremente für bestimmte Strukturelemente angegeben, aus denen man die ECR-Faktoren berechnen kann.<sup>[71]</sup> In Abschnitt 10.4 sind diese Faktoren für die in dieser Arbeit relevanten Analyten aufgelistet.

### Substituentenverteilung innerhalb der Glucoseeinheit

In Abb. 1.6 sind die möglichen Substitutionsmuster eines 1,6-verknüpften Glucans (z.B. Dextran) nach einer Polymer-analogen Modifikation gezeigt.

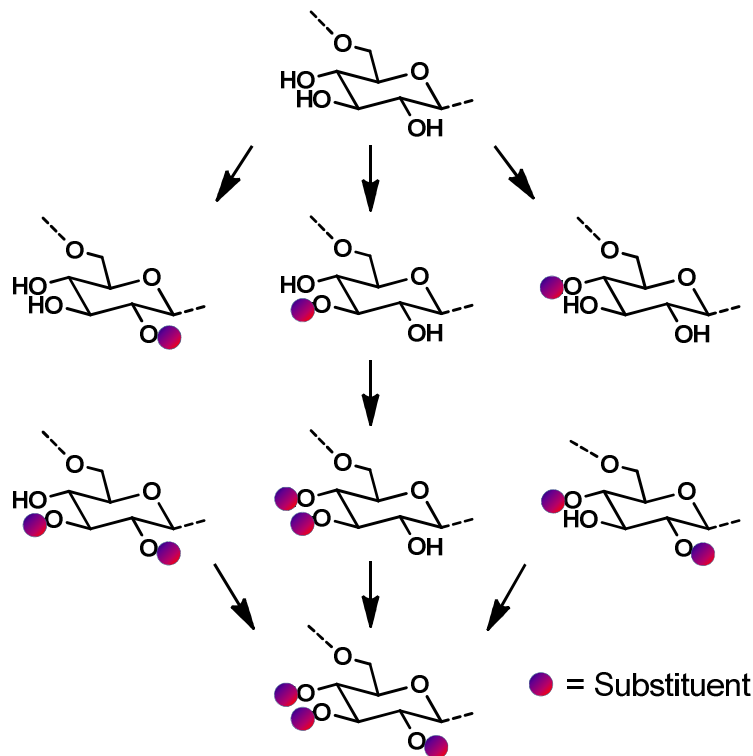


Abb. 1.6: Schema der Derivatisierung eines 1,6-verknüpften Polysaccharids und resultierende Monomermuster in einer polymer-analogen Reaktion (terminale und verzweigte Glucoseeinheiten werden vernachlässigt).

Bei der quantitativen Analyse bzw. statistischen Auswertung der Monomerzusammensetzung von Dextran- und Pullulanderivaten sind die strukturellen Besonderheiten der beiden Glucane zu beachten. Durch die im Dextranmolekül auftretenden Verzweigungen spielt die Position 6 der terminalen Glucoseeinheiten trotz der 1,6-Verknüpfungen der Hauptkette eine nicht zu vernachlässigende Rolle. Entsprechend dem Verzweigungsgrad erhöht sich der Anteil von zur Verfügung stehenden Hydroxylgruppen in Position 6 zu Lasten der verzweigten Positionen (hier O-3). Bedingt durch den linearen Aufbau des Pullulans aus  $\alpha$ -1,6-verknüpften Maltotrioseeinheiten ergeben sich Verhältnisse für die Verfügbarkeit von Hydroxylgruppen von 1 : 1 : 0,33 : 0,67 für die Positionen 2, 3, 4 und 6. Diese Möglichkeiten der Substitution, müssen bei der statistischen Berechnung und Interpretation berücksichtigt werden.

Um die experimentell bestimmten Substitutionsmuster hinsichtlich Heterogenität oder Nachbargruppeneffekten bewerten zu können, muss die statistische Substituentenverteilung für die gefundenen partiellen  $x_i$ -Werte berechnet werden. Spurlin veröffentlichte schon 1939 das nach ihm benannte Modell zur statistischen Auswertung der Substituentenverteilung in der Anhydroglucoseeinheit (AGU) von Cellulosederivaten. Dabei werden die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktionen an den verschiedenen Hydroxylgruppen relativ zueinander als konstant betrachtet, auch wenn die absolute Reaktionsgeschwindigkeit mit Abnahme der Eduktkonzentration sinkt. Zudem wird angenommen, dass alle

Hydroxylgruppen gleich gut zugänglich sind. Bereits erfolgte Substitutionen beeinflussen den weiteren Reaktionsverlauf nicht. Der Einfluss der Kettenenden wird vernachlässigt.<sup>[74]</sup> Sofern diese Annahmen erfüllt sind, stimmen experimentelle und berechnete Daten überein.

Aus den partiellen DS-Werten der unterschiedlichen Positionen in der Glucoseeinheit können die relativen Geschwindigkeitskonstanten ( $x_i$ ) ermittelt werden. Für bestimmte,  $x_i$ -Werte kann eine statistische Verteilung der acht möglichen Monomere ( $s_0, s_2$ , usw.) und daraus der un-, mono-, di-, tri- substituierten Anteile ( $c_0, c_1, c_2$  und  $c_3$ ) berechnet und mit den experimentellen Daten für ein Glucanderivat verglichen werden. Abweichungen der realen von der berechneten, statistischen Verteilung geben dann Hinweise auf Effekte bei der Substitution, wie z.B. die Erhöhung der Reaktivität durch Erstsitution einer benachbarten Position.

Durch Reuben erfolgte 1986 eine Erweiterung des Modells. Bei dieser Herangehensweise wird die bei Cellulosederivaten beobachtete Erhöhung der Reaktivität von Position 3 durch Erstsitution in Position 2 beschrieben.<sup>[75]</sup> Ein intramonomerer Nachbargruppen-effekt tritt auf und ist beispielweise bei einer Hydroxyalkylsubstitution zu beobachten.<sup>[76]</sup>

Arisz erweiterte das statistische Modell auf oligomere Abbauprodukte von Methylcellulosen und führte einen Heterogenitätsparameter  $H_1$  ein.<sup>[77]</sup> Dieser ist ein Maß für die durchschnittliche Abweichung vom berechneten statistischen Modell, also die Berechnung der Standardabweichungen und muss immer in Abhängigkeit vom Substitutionsgrad betrachtet werden, da mögliche Abweichungen bei sehr hohen oder sehr niedrigen DS-Werten zwangsläufig gegen Null gehen.

$$H_1 = \sqrt{\sum_{i=0}^{234} \Delta s_i^2 / n} \quad (1.5)$$

Es gilt  $\Delta s_i = s_i(\text{theoretisch}) - s_i$ , wobei  $s_i$  die Molfraktion der Glucoseeinheiten darstellt, die in Position  $i$  substituiert sind. In der vorliegenden Arbeit wird die Berechnung der Heterogenität im Sinne einer Standardabweichung (dividiert durch  $n$ ) modifiziert. Wobei  $n$  die Anzahl möglicher Muster der Glucosen nach Derivatisierung mit  $n = 8$  für Dextran und  $n = 12$  für Pullulan beschreibt.

## 1.4 Nanopartikel

Im Folgenden werden Definitionen und rechtliche Grundlagen für Nanomaterialien im Allgemeinen dargestellt. In Kapitel 7 werden Synthese und Charakterisierung thematisiert.

Das Wort „nano“ leitet sich vom griechischen Wort für Zwerg (nános) ab. Ein Nanometer entspricht  $10^{-9}$  m. Ein normales Blatt Papier ist ca. 100.000 nm dick. In Abb. 1.7 sind die Größenverhältnisse im Mikro- und Nanobereich anhand von Beispielen dargestellt.<sup>[78-80]</sup>

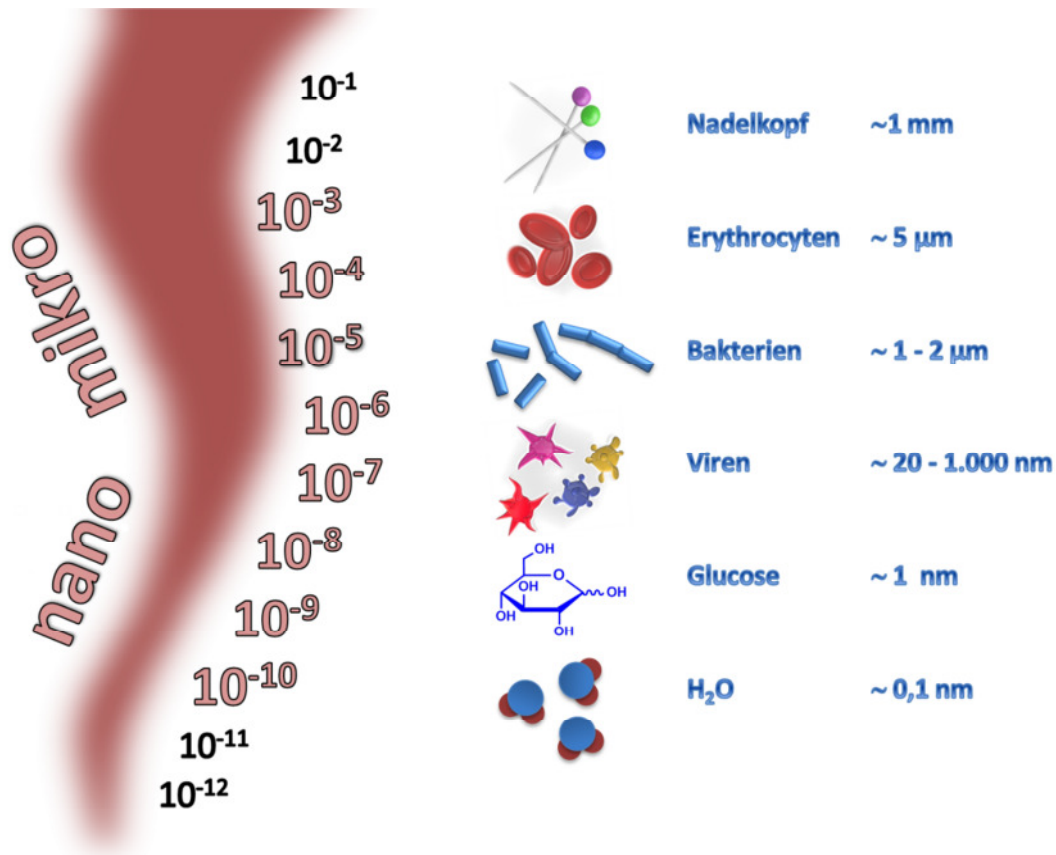


Abb. 1.7: Größenskala im Mikro- und Nanobereich.

Als Gründer der Nanotechnologie gilt Richard Feynman mit seiner Rede auf dem jährlichen Meeting der American Physical Society in Californien „There's plenty of room at the bottom“ deren Konzept 1960 veröffentlicht wurde.<sup>[81]</sup> 1974 wurde der Begriff „Nanotechnology“ von Norio Taniguchi eingeführt und von ihm wie folgt beschrieben: „Nanotechnology mainly consists of the processing of separation, consolidation and deformation of materials by one atom or one molecule“.<sup>[82]</sup>

Als Vorläufer der Nanoforschung kann die Kolloidchemie gesehen werden. In dieser Disziplin wird seit jeher mit Dispersionen mit Tröpfchengrößen im Bereich von 1 bis 500 nm gearbeitet. Hier wurden die Grundlagen zur Erforschung der Grenz- und Oberflächenchemie gelegt. Die Entwicklung der Filmwaage von Agnes Pockels (später zur Langmuir-Blodgett Filmwaage weiterentwickelt) ist nur ein Beispiel von vielen.<sup>[83]</sup>

In der Empfehlung der Europäischen Kommission zur Definition von Nanomaterialien (2011/696/EU) vom 18. Oktober 2011 werden diese wie folgt charakterisiert:

„Nanomaterial“ ist ein natürliches, bei Prozessen anfallendes oder hergestelltes Material, das Partikel in ungebundenem Zustand, als Aggregat oder als Agglomerat enthält, und bei dem mindestens 50 % der Partikel in der Anzahlgrößenverteilung ein oder mehrere Außenmaße im Bereich von 1 nm bis 100 nm haben.

Dabei werden Partikel als sehr kleine Teilchen einer Substanz mit definierten physikalischen Grenzen und Agglomerate als Ansammlung schwach gebundener Partikel (in der die resultierende Oberfläche ähnlich der Summe der Oberflächen der einzelnen Bestandteile ist) definiert. Als Aggregate werden Partikel definiert, die aus fest gebundenen oder verschmolzenen Partikeln bestehen.<sup>[84]</sup> Die internationale Organisation für Normung definiert den Begriff „Nanomaterial“ als Material mit Ausmaßen im Nanobereich oder einer inneren Struktur oder Oberflächenstruktur im Nanobereich. Nach der standardisierten Definition der ISO/TS 27687:2008 werden Nanopartikel konventionsgemäß als absichtlich bzw. gezielt hergestellte partikuläre (d.h. unlösliche) Objekte mit einer Größe im Bereich von 1 bis 100 nm betrachtet.<sup>[85]</sup> Natürlich vorkommende Nanostrukturen wie z.B. Kieselalgen oder Aschepartikel von Vulkanausbrüchen fallen somit nicht unter diese Definition. Allgemeiner werden auch die sprunghaften Eigenschaftsänderungen der Nanomaterialien im Vergleich zum ausgedehnten Festkörper (bulk material) als Definitionsgrundlage für „nano“ verwendet.

Eine EU-weite, eigenständige Regelung für die Verwendung von Nanomaterialien in Lebensmitteln oder für Bedarfsgegenstände gibt es bisher nicht. Als rechtliche Grundlagen gelten Artikel 14 und 17 der BasisVO 178/2002 oder die Novel-Food-VO (EC 258/97), die neuartige Lebensmittel und Lebensmittelzutaten definiert (insbesondere solche mit neuer oder gezielt modifizierter primärer Molekularstruktur (Art. 1 Abs. 2), die durch ein neuartiges Verfahren hergestellt und dadurch in der Zusammensetzung und Struktur wesentlich verändert wurden).<sup>[86,87]</sup> Für die Anwendung von Nanomaterialien in Kosmetika tritt ab 2012 die Verordnung (EG) Nr. 1223/2009 über kosmetische Mittel (Neufassung) in Kraft. Dort wird die Sicherstellung eines hohen Gesundheitsschutzniveaus für kosmetische Mittel, die Nanomaterialien enthalten, gefordert (Artikel 16 (1)) und in Artikel 19 die Kennzeichnung von Nanomaterialien vorgeschrieben.<sup>[88]</sup> Durch die Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 18. Dezember 2006 über die Registrierung, Bewertung und Zulassung von Chemikalien (Registration, Evaluation and Authorisation) vom 1. Juni 2007 werden die Rahmenbedingungen für den sicheren Umgang mit Chemikalien festgelegt, zu denen auch nanostrukturierte Materialien gezählt werden.<sup>[89]</sup>

## Verwendung von Nanomaterialien

Die Verwendung von Nanomaterialien ist so vielfältig wie ihre Zusammensetzung, ihre Form sowie ihre chemischen, physikalischen oder optischen Eigenschaften, sodass hier lediglich eine kurze Übersicht gegeben werden kann.

In der Chemie werden Nanomaterialien durch ihr extrem großes Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis für katalytische Anwendungen, selektive Filtrationsvorgänge sowie Ladungstrennungs- und Adsorptionsprozesse eingesetzt. Im Umweltsektor werden sie zur Abwasserreinigung oder Photokatalyse genutzt. Die Bauindustrie testet Nanomaterialien in Form von abweisenden Oberflächen, zur Wärmedämmung oder zum Korrosionsschutz. In der Automobilindustrie wird Nanotechnologie zur Generierung von kratzfesten Lacken, Sensoren oder von Katalysatorbestandteilen eingesetzt. In der Informationstechnik werden die Synthese von elektronischem Papier, Displays, Polymerelektronik, Sensortechnologie und Biochips verstärkt erforscht. Im Bereich der Optik sind Nanopartikel für Anwendungen in der Photonik, Entspiegelung oder als optische Speicher von großem Interesse.<sup>[78-80]</sup>

Auch in Kosmetika und Bedarfsgegenständen werden Nanostrukturen, z.B. zum Sonnenschutz ( $\text{TiO}_2$ ) oder in antimikrobiellen Textilien und Haushaltsgegenständen (Silberpartikel) verwendet.<sup>[78-80]</sup> In der Lebensmittelbranche sind vor allem Emulsionen im nanoskaligen Bereich (z.B. Diätmayonnaise), neuartige funktionelle Verpackungen oder die Verkapselung von Wirkstoffen (z.B. Nahrungsergänzungsmittel) mögliche Einsatzgebiete.<sup>[13,90]</sup> Nanolamine, also mehrere Schichten mit wenigen Nanometer Durchmesser, können für verbesserte essbare Beschichtungen, als Barriere gegen Fett, Feuchtigkeit oder Gas, als Texturverbesserer oder als Transporter für funktionelle Stoffe (z.B. Farbstoffe, Aromen, Antioxidantien, Vitamine, antimikrobielle Stoffe) eingesetzt werden. Durch eine Kombination von lipidbasierten Filmen mit solchen auf Biopolymerbasis können Eigenschaften wie Wasserundurchlässigkeit mit mechanischer Stabilität kombiniert werden.<sup>[91]</sup>

Das Inventory über Nano-Produkte des Woodrow Wilson International Center for Scholars (<http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer>) listet die Produkte in denen Nanotechnologie verwendet wird und die bereits auf dem Markt erhältlich sind auf. So gibt es in der Kategorie „Food and Beverage“ z.B. einen Nano-Tee oder mit Nanosilber beschichtete Küchengeräte.<sup>[92]</sup>

Im Gesundheitssektor werden Nanopartikel zur Diagnostik, Therapie, Wirkstofffreisetzung oder -transport, zur Nachbildung von Gewebe (Tissue engineering) oder zur Implantatbeschichtung getestet.<sup>[93,94]</sup>

Großes Potential haben hier mit Polymeren beschichtete Eisenoxid-Nanopartikel, die beispielsweise als paramagnetische Kontrastmedien (Magnetic resonance imaging, MRI) oder in Hyperthermieranwendungen eingesetzt werden. Aufgrund dieser vielfältigen Einsatzmöglichkeiten und der relativ einfachen Synthese sind magnetische Eisenoxid-Nanopartikel vielversprechende Werkzeuge.

Für die Mehrzahl dieser Anwendungen ist es von Vorteil wässrige Dispersionen dieser Partikel vorliegen zu haben. Dies kann beispielsweise durch Einbettung in eine Glucanmatrix realisiert werden. Dadurch erfolgt zugleich eine Stabilisierung der Partikel durch Schutz vor oxidativen Veränderungen und Agglomeration. Zudem können über Funktionalisierung des Polysaccharids spezifische Eigenschaften eingebracht werden. Die Partikel können zielgerichtet auf ihre Anwendung hin modifiziert werden.<sup>[12,14,95,96]</sup>

Durch die Beschichtung oder Einkapselung von magnetischen Nanopartikeln mit geeigneten Polymeren können sie als Separationsmedium („fishing“) in biologischen, chemischen, medizinischen oder ökologischen Anwendungen eingesetzt werden. Die partikelgebundenen Komponenten (z.B. anorganische Stoffe, Zellen, Enzyme, Antikörper, Bakterien) können zielgerichtet, schnell und kostengünstig abgetrennt werden. Dabei reicht die Art der Wechselwirkung, nach Funktionalisierung der Partikel von nicht-spezifischen über gruppenspezifische bis hin zu spezifischen Interaktionen. Seit längerem bekannt ist der Einsatz von Partikeln mit schwach sauren, schwach basischen ( $-NH_2$ ) oder stark basischen Gruppen in Ionenaustauschprozessen zur Wasseraufbereitung.<sup>[97]</sup>

Ein weiteres Beispiel sind magnetische Partikel, die mit modifiziertem Polyglycidylmethacrylate beschichtet wurden und zu Isolation von Bakterien-DNA aus Milchprodukten eingesetzt werden konnten.<sup>[98]</sup>

## 2 Ziel

Ziel dieser Arbeit ist die Derivatisierung der Glucane Dextran und Pullulan, eine detaillierte strukturelle Analyse der Produkte sowie die Untersuchung ihrer Eignung zur Nanostrukturierung. Diese Glucane sind biokompatibel und erlauben den Vergleich zwischen einem verzweigten (Dextran) und einem linearen Polysaccharid (Pullulan).

Es sollen Studien zur Polymer-analogen Modifikation von Dextranen und Pullulan durchgeführt und die bisher bei diesen Glucanen kaum beachtete Regioselektivität der Substituentenverteilung analysiert werden. Im Einzelnen wird die Alkylierung nach Williamsonscher Ethersynthese, die Bildung von Cyanoethylglucanen durch Michael-Addition, die Reduktion von Cyanoethylpolysacchariden zu Aminopropylglucanen sowie deren Kopplung an verschiedenen Aldehyden mittels reduktiver Aminierung durchgeführt.

Des Weiteren soll die strukturelle Charakterisierung der Pullulan- und Dextranderivate mittels Elementaranalyse, ATR-IR-Spektroskopie, NMR-Spektroskopie und Gaschromatographie erfolgen, wobei als Parameter der Substitutionsgrad, das Substitutionsmuster auf Monomerebene sowie die Produktreinheit (bzw. Bildung von Nebenprodukten) im Fokus stehen.

Als Beispiele für Alkylierungsreaktionen sollen Methyl- und Ethylsubstituenten in die Polysaccharide eingeführt werden. Die Produkte sind aufgrund der stabilen Bindung der Substituenten bei dieser kinetisch kontrollierten Reaktion gut zu analysieren und der sterische Einfluss dieser einfachen organischen Reste ist zu vernachlässigen. Durch die Analyse der Substituentenverteilung sollen Informationen über die Regioselektivität gewonnen und Abweichungen von der statistischen Substituentenverteilung erkannt werden.

Durch die Reaktion von Pullulan und Dextran mit Acrylnitril entstehen in der thermodynamisch kontrollierten Michael-Addition Cyanoethylglucane. Diese sind nicht nur aufgrund des starken -M-Effekts, des Dipolmoments und den elektroaktiven Eigenschaften interessant, sondern stellen zudem eine wichtige Vorstufe für aminofunktionalisierte Polysaccharide dar. Aufgrund ihrer Reaktivität sind Aminogruppen wichtige Kopplungsstellen in der organischen Chemie. Beispielsweise können sie an Carbonylverbindungen (reduktive Aminierung) Carbonsäurederivate (Amidierung) oder Oxirane (Addition) gekoppelt werden.

Nach erfolgreicher Synthese und Charakterisierung der verschiedenen Glucanderivate soll deren Eignung zur Nanostrukturierung durch Self-assembly getestet werden. Die



Derivatisierung der Polysaccharide dient zur Einführung hydrophober Substituenten, welche die Bildung von Nanostrukturen aufgrund der amphiphilen Wechselwirkungen erst möglich machen.

Darüber hinaus soll geprüft werden, ob eine Einbettung von magnetischen Eisenoxidpartikeln in die Glucanmatrix durch eingeführte Funktionalitäten gefördert wird.

Die synthetisierten Eisenoxid-Nanopartikel werden hinsichtlich ihrer magnetischen Eigenschaften und der vorliegenden Größenverteilung analysiert.

Als Ergebnis dieser Arbeit sollen mit funktionalisierten Polysacchariden beschichtete Eisenoxid-Nanopartikel vorliegen, die potenzielle Anwendung in biotechnologischen, biomedizinischen oder technischen Bereichen finden können.

### 3 Alkylglucane

In diesem Abschnitt werden die verschiedenen Methoden zur Alkylierung von Polysacchariden vorgestellt. Als Alkylierungsreagenzien wurden Methyl- und Ethyliodid verwendet. Die Methylgruppe ist einer der kleinsten organischen Reste, der Einfluss von sterischen Effekten auf die Reaktion ist daher vernachlässigbar. Für Methylpolysaccharide gibt es zudem etablierte Analyseverfahren.<sup>[49]</sup> Erkenntnisse über den Einfluss der steigenden Kettenlänge werden durch die Einführung von Ethylsubstituenten in einer zweiten Reaktionsreihe analysiert.

Durch Analyse der Alkylierungsprodukte können relative Reaktivitäten der Hydroxylgruppen und Abweichungen vom Spurlin-Modell (Substituentenverteilung in der Glucoseeinheit) erkannt werden. Zudem sollte der Einfluss unterschiedlicher Reaktionssysteme (Lösungsmittel/Base) untersucht werden. Ergebnisse zur Methylierung von Dextranen wurden bereits veröffentlicht.<sup>[49]</sup>

#### 3.1 Grundlagen zur Alkylierung von Glucanen

Die vollständige Methylierung (Permethylierung) aller Hydroxylgruppen ist die wichtigste Grundlage der Strukturaufklärung von Polysacchariden (Methylierungsanalyse).<sup>[99]</sup> Verknüpfungsstellen der einzelnen Bausteine und somit auch der Verzweigungsgrad können so bestimmt werden.<sup>[100-102]</sup> Die partielle Alkylierung ist von großer industrieller Bedeutung zur Gewinnung von Kohlenhydratderivaten, wie z.B. Methyl- oder Ethylcellulose. So gibt es für die Methylierung von Polysacchariden eine große Anzahl an Vorgehensweisen.<sup>[99]</sup> Je nach eingesetztem Polysaccharid und gewünschtem Substitutionsgrad können die Bedingungen gewählt werden. Einer der ersten methylierten Zucker wurde von Purdie bereits 1903 unter Verwendung von Silberoxid und Methyliodid hergestellt.<sup>[103]</sup>

Basierend auf den Arbeiten von Haworth und Kuhn wurde die Methylierung in DMSO oder DMF mit nichtoxidierenden Basen, wie z.B. BaO oder BaOH eingeführt.<sup>[104,105]</sup> Zuvor verwendetes Silberoxid ( $\text{Ag}_2\text{O}$ ) führte bei reduzierenden Zuckern zu Nebenreaktionen wie der Oxidation zu Carboxyestern, ist aber eine milde Alternative zur Alkylierung mit starken Basen. Nachteilig war auch die Verwendung von Methanol als Lösungsmittel, da dieses nicht inert ist und selbst teilweise methyliert wird.<sup>[99]</sup> Die Alkylierung von Polysacchariden folgt dem Reaktionsmechanismus der Williamsonschen Ethersynthese ( $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion). Im ersten Reaktionsschritt erfolgt die Deprotonierung der Hydroxylgruppen ( $\text{pK}_{\text{a}}$ -Wert  $\sim 12 - 14$ ) durch die eingesetzte Base, um die stärker nucleophile Alkoholatform des

Polysaccharids zu erhalten. Danach folgt der Angriff des Alkoholats auf das Alkylhalogenid. Typisch ist das Durchlaufen eines Übergangszustandes, in welchem eine Inversion am reagierenden Kohlenstoffatom erfolgt (relevant bei chiralen Alkylierungsmitteln).

Im Labormaßstab werden zumeist Alkylbromide, -iodide oder Dimethylsulfat verwendet. Industriell werden Chloride eingesetzt. Die Etherbildung ist irreversibel. Es handelt sich um eine kinetisch kontrollierte Reaktion. Die partiellen DS-Werte sollten daher die relativen Reaktivitäten der einzelnen Hydroxylgruppen widerspiegeln. Nachbargruppeneffekte sind (bei guter Aktivierung) nicht zu erwarten.<sup>[48,102]</sup>

Die Alkylierung von Polysacchariden kann sowohl in homogenen, als auch in heterogenen Reaktionen, mitunter auch mit Zusätzen wie Tetramethylharnstoff (als Wasserstoffbrückenbrecher) durchgeführt werden.<sup>[99,100]</sup> Maßgeblich sind die Löslichkeitseigenschaften des eingesetzten Polysaccharids und der gewünschte Substitutionsgrad. In jüngster Zeit wurden Veretherungen von Polysacchariden in ionischen Flüssigkeiten durchgeführt. So konnten durch die Reaktion von 1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan in ionischen Flüssigkeiten (z.B. 1-Ethyl-3-methylimidazoliumacetat) Trimethylcellulosen mit einem Substitutionsgrad bis zu 2,89 dargestellt werden.<sup>[106]</sup>

### 3.1.1 Alkylierung mit Lithium-Dimsyl in DMSO

Die Darstellung von Alkylpolysacchariden in einem homogenen Reaktionssystem kann mit der Methode nach Hakomori<sup>[47]</sup> realisiert werden. Hierzu müssen die Base, das Polysaccharid und auch seine deprotonierte Form (Polyanion) im Reaktionsmedium löslich sein. Durch Zugabe von starken Basen, wie NaH, KH, n-Butyllithium oder Methyllithium zu DMSO entsteht durch Deprotonierung das Methylsulfinylmethanid (auch als Dimsyl-Anion bezeichnet (siehe Abb. 3.1 a). Hakomori setzte NaH als Base ein, um Na-Dimsyl zu generieren (vergleiche Abb. 3.1 b). Die Bildung von Li-Dimsyl unter Verwendung von Methyllithium und DMSO ist im Vergleich zur Verwendung von NaH einfacher zu handhaben und gut zur Methylierung von Glucanen geeignet.<sup>[101]</sup> Li-Dimsyl ist eine stärkere Base als NaOH ( $pK_a$ -Wert: Li-Dimsyl  $\sim 35$ , NaOH  $\sim 15,7$ )<sup>[107]</sup> und ist aufgrund der Löslichkeitseigenschaften besonders gut für Permethylierungen von Kohlenhydraten geeignet. Im Gegensatz zur Verwendung von NaOH wird hier im ersten Reaktionsschritt ein Polyanion gebildet. Li-Dimsyl muss unter Ausschluss von Feuchtigkeit verwendet werden. Bei Raumtemperatur unter Stickstoffatmosphäre beträgt die Stabilität der Dimsyl-Lösung nur wenige Stunden und sie sollte daher immer frisch vor der Reaktion bereitet werden.

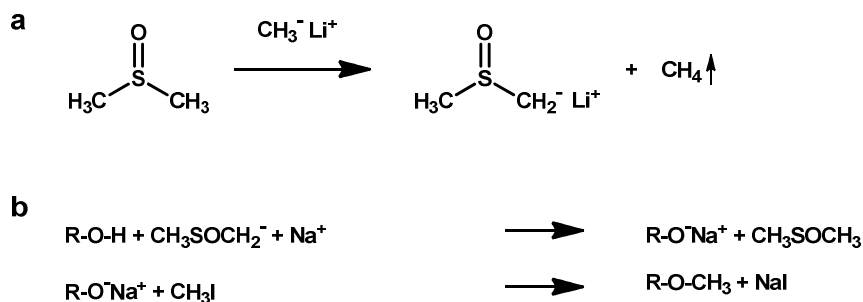


Abb. 3.1: (a) Bildung von Lithiumdimsyl, (b) Methylierung nach Hakomori.<sup>[47]</sup>

### 3.1.2 Alkylierung mit Natriumhydroxid in DMSO

Bei dieser Reaktionsführung, in Anlehnung an Ciucanu und Kerek<sup>[108]</sup> wird fein gepulvertes NaOH als Base in DMSO verwendet (vergleiche Abb. 3.2).

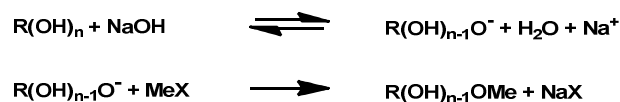


Abb. 3.2: Reaktionsgleichung Methylierung nach Ciucanu und Kerek.<sup>[108]</sup>

Es liegt heterogenes System aus Feststoff und Lösungsmittel vor, da NaOH in DMSO nicht löslich ist. Von Vorteil sind die hygroskopischen Eigenschaften dieser Base, da das bei der Methylierung als Nebenprodukt entstehende Wasser gleich gebunden wird. Die Deprotonierung kann, wie es Abb. 3.3 nach dem Modell von Scheutjens und Fleer zeigt, nur an der Basenoberfläche stattfinden. Die Polymerketten liegen während der Reaktion angelagert an der Oberfläche (Train) vor. Es gibt jedoch auch Schleifen (Loops) und freie Enden (Tails).<sup>[100,109]</sup>

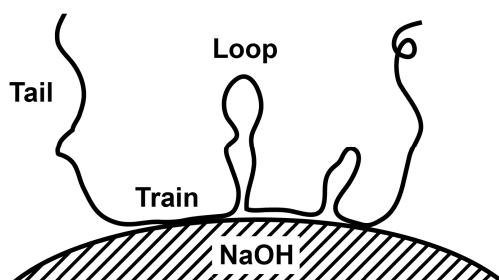


Abb. 3.3: Modell der Adsorption von Glucanen an NaOH. Abb. nach Mischnick und Kühn.<sup>[100]</sup>

Die effektive Basenkonzentration und somit auch die Reaktivität ist also von der Größe der Natriumhydroxidpartikel abhängig. Für gleichmäßige Alkylierung ist es deshalb notwendig, das NaOH möglichst fein pulverisiert und verteilt im Reaktionsansatz vorliegen zu haben. Die Heterogenität der Substituentenverteilung, die aus dieser Art der Alkoxidbildung resultiert wurde von Mischnick und Kühn an Methylamylosen untersucht. Hierbei zeigte die Reaktion in DMSO mit festem NaOH ein bimodales Substitutions-

muster, während die Reaktion in Wasser mit KOH zu der erwarteten zufälligen Verteilung der Methylsubstituenten führte.<sup>[100]</sup> Von Heinze wurde diese Art der Reaktion als „Induced Phase Separation“ beschrieben und anhand der Bildung von Carboxymethylstärke bzw. -cellulose (Cellulose in DMA/LiCl, Stärke in DMSO) untersucht. In den Positionen 3 und 6 wurde eine effektivere Substitution bei der Verwendung von festen NaOH Partikeln festgestellt. Die Analyse der Substituentenverteilung nach Hydrolyse ( $\text{HClO}_4$ ) zeigte gegenüber dem statistischen Modell eine Erhöhung von unsubstituierten sowie 2,3,6-trisubstituierten Monomeren und ist damit ein Hinweis auf eine stark heterogene, vermeintlich blockartige Verteilung entlang des Polymerstranges. Mit den Ergebnissen aus der Größenausschlusschromatographie (nach enzymatischen Abbau) konnte die Vermutung gestärkt werden, dass die Reaktion auf diese Art und Weise erfolgte und die „blockartige“ Verteilung, d.h. die Existenz hoch- und unsubstituierter Bereiche bestätigt werden.<sup>[109,110]</sup>

### 3.1.3 Nebenreaktionen bei der Alkylierung von Polysacchariden

Ein Problem ist der oxidative Abbau von Kohlenhydraten in Alkylierungen mit NaOH, MeI und DMSO. Needs et al. beschrieben den Mechanismus dieser Oxidation. Ursache ist die Bildung eines Dimethylsulfoniumsalzes aus der Reaktion von Methyljodid mit DMSO, welches die Alkoxide zu den korrespondierenden Carbonylverbindungen oxidiert (Abb. 3.4).<sup>[111]</sup>

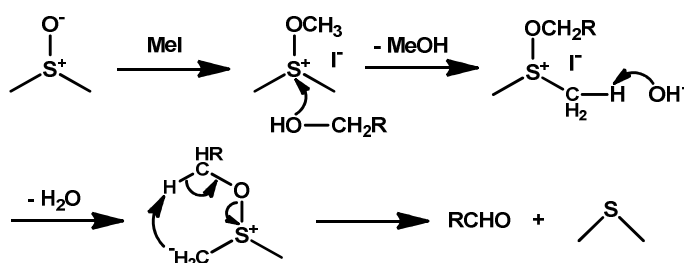


Abb. 3.4: Vorgeschlagener Mechanismus der Oxidation von Kohlenhydraten durch ein Dimethylsulfoniumsalz. Der Prozess ist anhand eines primären Alkohols ( $\text{RCH}_2\text{OH}$ ) dargestellt.<sup>[111]</sup>

York et al. bewiesen diese Nebenreaktion bei der Permethylierung der Modellverbindung Cellobiitol-1-*d*. Die signifikante Oxidation bei der Permethylierung von Alditolen in dem Reaktionssystem NaOH/MeI/DMSO konnte mittels GC-EI-MS-Analytik gezeigt werden.<sup>[112]</sup> Um diese Nebenreaktion zu verhindern, gibt es verschiedene Vorgehensweisen. So sollte zuerst NaOH zur Polysaccharidlösung gegeben werden, bevor das Alkylierungsmittel zugefügt wird. Auch die Neutralisation des Reaktionsgemisches vor Extraktion der Alkylierungsprodukte wird empfohlen.<sup>[111,113]</sup> Als weitere Nebenreaktion bei alkalischen Alkylierungen ist der Peeling-Prozess zu nennen (siehe Abb. 3.5). Dabei wird das

Polymer ausgehend vom freien, reduzierenden Ende des Polysaccharids partiell abgebaut, wobei die  $\beta$ -Eliminierung von 1-3-verknüpften Einheiten begünstigt ist. Nach einer de Bruyn-van Ekenstein-Umlagerung zur Ketose folgt eine  $\beta$ -Eliminierung aus Position 4. Die Stoppreaktion erfolgt durch Benzilsäureumlagerung des endständigen 3-Desoxyosons zur 3-Desoxyhexonsäure. Besonders bei Oligomeren ist der Abbau signifikant. Um diesen Vorgang zu verhindern, sollte vor der Alkylierung eine Reduktion durchgeführt werden.<sup>[114,115]</sup>

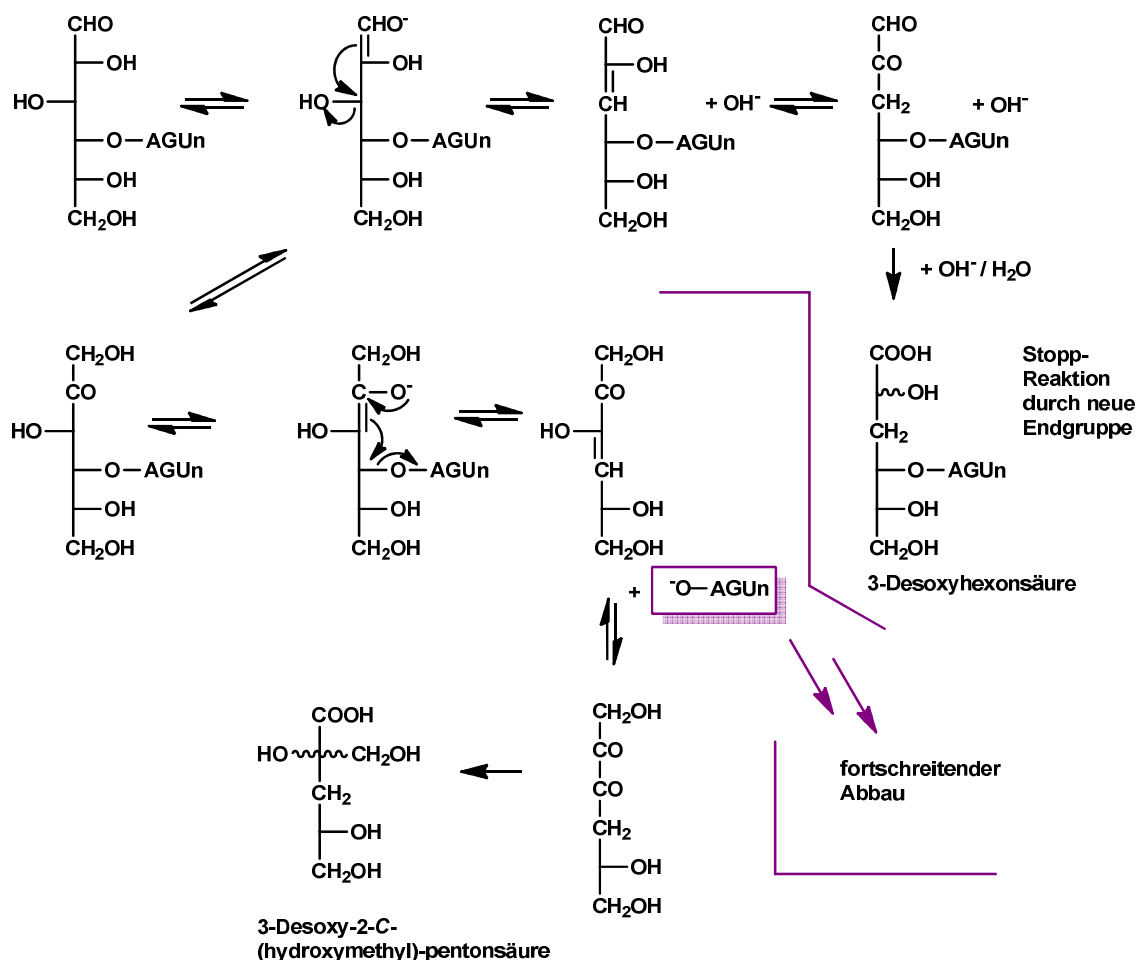


Abb. 3.5: Peeling von 1,4-Glucanen im alkalischen Milieu ( $\beta$ -Eliminierung) und Kettenabbruchreaktion. Abbildung nach Heinrich.<sup>[116]</sup>

### 3.1.4 Synthese von Alkylglucanen

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Alkylierungen mit Li-Dimsyl als Base wurde das getrocknete Polysaccharid in einen wasserfreien Schlenk Kolben eingewogen und in DMSO für 24 h unter Rühren gelöst. Zur Herstellung der Li-Dimsyl-Lösung (1,6 M) wurde entgastes, wasserfreies DMSO in einem Schlenk Kolben mit Methyllithium (5%ig in Diethylether) versetzt. Nach einer Stunde Reaktionszeit, wobei der Ether und das während der Bildung des Methylsulfinylmethanid-Anions entstandene Methan durch Kanülen entweichen konnten, lag eine klare Lösung vor. Die so hergestellte Dimsyl-Lösung wurde in der

entsprechenden Konzentration zur Polysaccharidlösung gegeben. Nach 1 h Reaktionszeit (Ausnahme: Untersuchung der Baseneinwirkzeit D-14 bis D-17: 3 - 1500 min), wurde dann das jeweilige Alkylierungsmittel (Methyliodid oder Ethyliodid) zugesetzt. Wenn nicht anders angegeben wurde die Reaktion für 24 h unter Rühren durchgeführt. Im Anschluss wurde das übrige Alkylierungsmittel im Hochvakuum entfernt. Das Alkylierungsprodukt wurde durch Dialyse und Gefriertrocknung isoliert. Vergleichend wurden auch Alkylierungen im protischen Lösungsmittel Wasser durchgeführt. Bei den Alkylierungen D-18 bis D-21 wurde das Dextran in Wasser unter Rühren (24 h) gelöst. Dann wurde Natriumhydroxid zugesetzt und nach Lösung erfolgte die Zugabe von Methyliodid. Die Isolierung erfolgte analog. Im Folgenden werden die einzelnen Versuchsreihen zur Alkylierung von Pullulan und Dextran anhand der Ergebnisse der gaschromatographische Analyse der Abbauprodukte nach Hydrolyse bzw. Methanolyse (HRA und Meglc/OTMS) diskutiert. In den ersten Versuchsreihen wurde der Einfluss von verschiedenen Äquivalenten an Base und Alkylierungsmittel auf die Substitution von Dextranen und Pullulan untersucht (D-1 bis D-7, P-5 bis P-12). Ethylierung und Methylierung werden verglichen. Als Base diente Li-Dimsyl. In den nächsten Reaktionen wurde die Baseneinwirkzeit variiert (D-14 bis D-17). Bei Alkylierung mit MeI und NaOH in einem polar protischen Lösungsmittel sind zwar Polysaccharid und Base gelöst, da Methyliodid in Wasser nicht löslich ist liegt ein zweiphasiges System vor. Das ist zum einen in Hinblick auf den DS-Wert, zum anderen in Bezug auf den Vergleich mit den statistischen Modellen interessant. In diesem System wurden zwei verschiedene Dextrane (70 und 500 kDa) für zwei Reaktionszeiten in parallel durchgeführten Reaktionen untersucht (D-18-1 bis 21-2).

### **3.1.5 Alkylierung mit steigenden Mengen an Base und Alkylierungsmittel**

Die Methylierung bzw. Ethylierung von Dextran (70 kDa) und Pullulan (100 kDa) wurde zunächst in einer Versuchsreihe mit steigenden Äquivalenten an Base (Li-Dimsyl) und Alkylierungsmittel durchgeführt. Im Lösungsmittel DMSO sind sowohl das Glucan als auch die Base löslich. Bei Zugabe der Base zur Polysaccharidlösung war in den ersten Minuten eine Gelbildung zu beobachten, die mit zunehmender Basenmenge stärker ausgeprägt war. Die Methylierungsansätze tragen die Bezeichnungen D-1 bis D-4 für die Dextrane und P-9 bis P-12 für die Pullulane. Ethylierungsreaktionen sind mit den Bezeichnungen D-5 bis D-8 bzw. P-5 bis P-8 versehen. Die Versuchsbedingungen sind in Tabelle 3.1 mit Einwaagen (E) und Auswaagen (A) dargestellt. Für die Basenkonzentration sind berechnete Werte angegeben. Die tatsächliche Konzentration der Li-Dimsyl-Lösung kann bedingt durch Schwankungen der Methyllithiumkonzentration und Volumenfehler (differierende Umgebungstemperaturen) abweichen. Wie die folgenden Ergebnisse belegen, stimmen aber Relation und Größenordnung der berechneten DS-Werte.

Tabelle 3.1: Reaktionsbedingungen der Ethylierung und Methylierung von Dextran (70 kDa) und Pullulan (100 kDa) mit verschiedenen Äquivalenten an Base (Li-Dimsyl) sowie Alkylierungsmittel, 1%ige Lösung des Polysaccharids in DMSO. Die ausführlichen Monomerdaten befinden sich im Kapitel 11.

Ansatz	Li-dimsyl <sup>a</sup>	Alkylierungsmittel <sup>b</sup>		DS-Wert						E	A	Ausbeute <sup>f</sup>
				HRA <sup>d</sup>			Meglc/OTMS					
				eq/OH	Art	eq/OH <sup>c</sup>	DS <sub>ges</sub>	DS <sub>o6</sub> <sup>e</sup>	H <sub>1</sub>			
D-1	0,25	Mel	0,30	0,78	0,76	0,97	0,77	0,74	0,89	473	405	68
D-2	0,50	Mel	0,60	1,62	1,59	1,22	1,60	1,58	1,47	474	396	54
D-3	0,75	Mel	0,90	1,78	1,75	2,27	1,71	1,67	1,97	473	527	70
D-4	1,00	Mel	1,20	2,06	2,03	1,47	1,98	1,95	1,86	472	418	53
P-9	0,25	Mel	0,30	0,88		0,54	0,77		0,45	100	100	77
P-10	0,50	Mel	0,60	1,60		0,41	1,57		0,32	100	91	59
P-11	0,75	Mel	0,90	2,42		0,27	2,39		0,36	100	93	51
P-12	1,00	Mel	1,20	2,71		0,16	2,70		0,24	100	97	51
D-5	0,25	Etl	0,30	0,43	0,42	1,14				480	323	59
D-6	0,50	Etl	0,60	0,88	0,86	2,71				456	322	55
D-7	0,75	Etl	0,90	1,58	1,56	2,74				473	270	37
P-5	0,25	Etl	0,30	0,33		0,40				464	421	82
P-7	0,75	Etl	0,90	1,51		0,73				475	296	41
P-8	1,00	Etl	1,20	1,63		0,89				470	403	56

<sup>a</sup> 1 h Einwirkzeit der Base vor Alkylierungsmittelzugabe, <sup>b</sup> 24 h Reaktionszeit mit Alkylierungsmittel, <sup>c</sup> berechnete Äquivalente, <sup>d</sup> nach Hydrolyse, Reduktion, Acetylierung, <sup>e</sup> DS ohne terminale 6-O-Substitution, aus  $X_{6,i}$  zu  $X_i$  Addition, <sup>f</sup> DS-basierte Berechnung der Ausbeute mit DS<sub>ges</sub> HRA.



In Abb. 3.6 sind die Möglichkeiten zur Bestimmung des Methylsubstitutionsgrades mittels GLC und ESI-IT-MS-Analytik auf verschiedenen strukturellen Ebenen eines Polysaccharids am Beispiel von Dextran zusammengefasst, bevor die in dieser Arbeit genutzte Vorgehensweise detailliert erläutert wird.

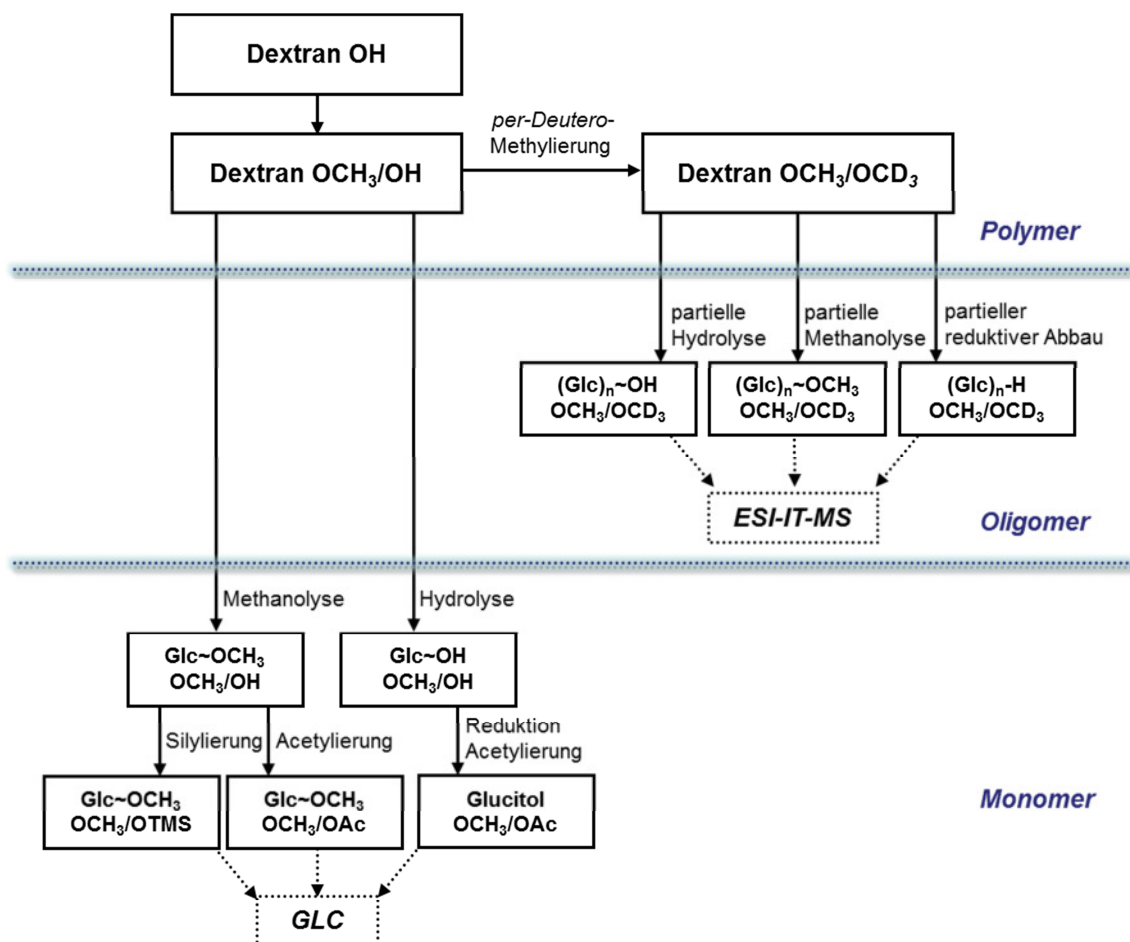


Abb. 3.6: Analytisches Vorgehen zur Bestimmung des Methylsubstitutionsgrades auf verschiedenen strukturellen Ebenen durch GLC und ESI-IT-MS-Analytik.<sup>[49]</sup>

Zur Analyse der Ethyl- und Methylglucane wurden diese mit 2 M TFA hydrolysiert, die resultierenden Glucosederivate wurden reduziert und anschließend acetyliert, um die Polysaccharide für die GC-Analytik zugänglich zu machen (siehe Abschnitt 1.3 und 10.4). Es konnten aber nicht alle Regioisomere der partiell alkylierten Sorbitacetate voneinander getrennt werden. Die 2,4- und 3,4-di-O-Methylsorbitderivate fallen in einem Peak zusammen. Nachteilig ist zudem die langwierige Probenvorbereitung vor der eigentlichen Messung. Alternativ wurde die Spaltung der Glucosidbindungen mittels methanolischer HCl durchgeführt. Hier entstehen jeweils  $\alpha$ - und  $\beta$ -Methylglucoside. Um die Methanolysenprodukte in eine flüchtige Form zu überführen, erfolgte die Umsetzung mit *N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA), Pyridin, und Trimethylchlorsilan (TMSCl) zu den jeweiligen Meglc/OTMS-Derivaten. Die vollständige Bestimmung der Monomerzusammensetzung war nur mit einer Kombination der Auswertung der Gaschromatogramme

dieser beiden Derivattypen möglich. Die Ergebnisse der gaschromatographischen Analyse der silylierten Methylglucoside wurden genutzt um das Verhältnis der ungetrennten 2,4- und 3,4-Di-*O*-methylsorbitderivate zu berechnen. Nachteil der Methanolyse ist, dass durch die Bildung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glucosiden jeweils zwei Peaks pro Substitutionsmuster entstehen, wodurch die Auftrennung erschwert wird. Fallen einzelne Muster in einem Peak zusammen, so können sie über die Anomerenverhältnisse berechnet werden. Die Methanolyse mit anschließender Trimethylsilylierung ist im Vergleich zur Reaktionsfolge HRA schneller und einfacher durchführbar. Im Folgenden sind die Gaschromatogramme von den Alditolacetaten (Abb. 3.7) und den silylierten Methylglucosiden (Abb. 3.8) von Methylpullulanen dargestellt.

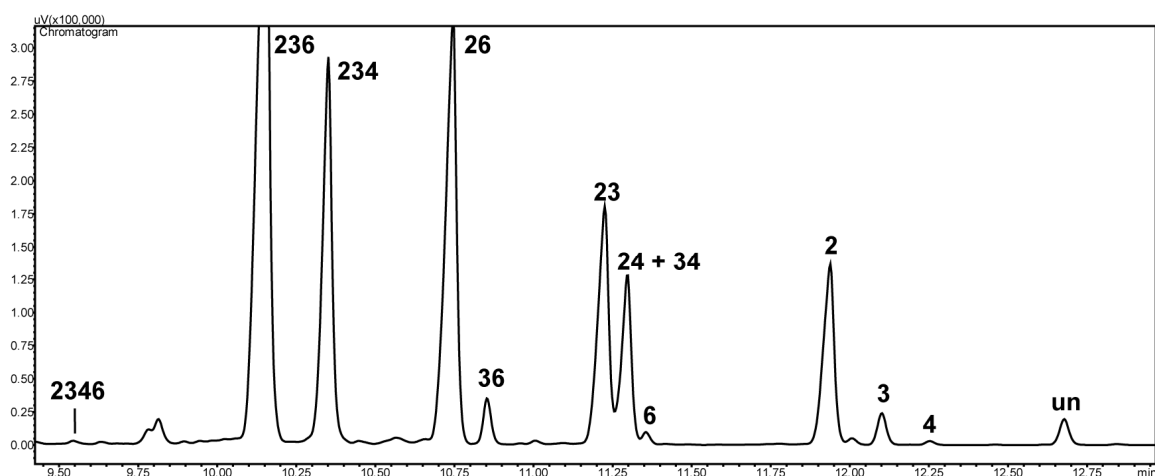


Abb. 3.7: Gaschromatogramm der Alditolacetate von Methylpullulan P-11 ( $DS = 2,42$ , vergleiche Tabelle 3.1). Die Peaks sind entsprechend den methylierten Positionen gekennzeichnet.

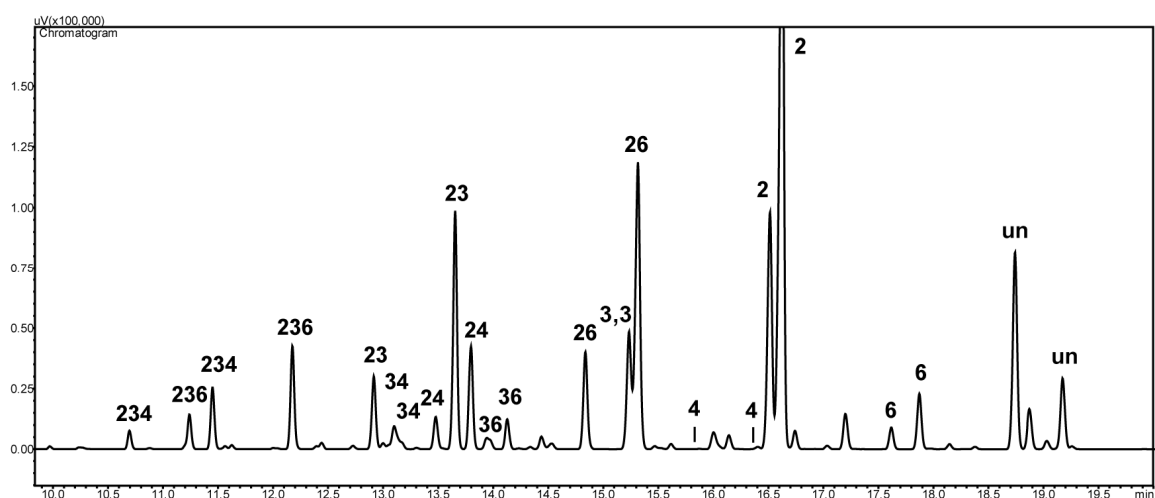


Abb. 3.8: Gaschromatogramm der trimethylsilylierten Methylglucoside von Methylpullulan P-10 ( $DS = 1,57$ , vergleiche Tabelle 3.1). Die Peaks sind entsprechend den methylierten Positionen gekennzeichnet.

Bei Einsatz von 0,25 bis 1,00 eq Li-Dimsyl und Methyljodid wurden  $DS_{Me}$ -Werte von 0,77 bis 1,98 bei Dextran (Meglc/OTMS-Derivatisierung) und von 0,77 bis 2,70 bei der Methylierung der Pullulane erhalten. Die  $DS_{Et}$ -Werte liegen mit gleichen Mengen an Base und Ethyljodid von 0,33 bis 1,63 erwartungsgemäß deutlich tiefer.

Die Ergebnisse der gaschromatographischen Analysen belegen dass der DS-Wert mit Erhöhung der Äquivalente in den Methylierungen D-1 bis D-4 und P-9 bis P-12 und auch in den Ethylierungen D-5 bis D-7 bzw. P-5 bis P-8 erwartungsgemäß ansteigt. Die beiden Probenvorbereitungen für die GC-Analytik zeigen keine signifikanten Unterschiede (vergleiche Tabelle 3.1 und Abb. 3.9).

Bei Betrachtung der resultierenden DS-Werte für die Ansätze P-9 bis P-12, fällt auf, dass die tatsächliche Basenkonzentration höher gewesen sein muss, als die berechneten Äquivalente. Die relativen Werte und die Größenordnung sind aber stimmig.

Beim Vergleich des Anstiegs der DS-Werte zeigt sich für die Reaktionen D-1 bis D-2 und P-9 bis P-10 (0,25 - 0,50 eq Li-Dimsyl und 0,30 bis 0,60 eq Mel) ein synchroner, linearer Anstieg. Bei weiterer Erhöhung der Reaktionsäquivalente erfolgt bei der Methylierung von Dextran eine Abflachung, während die Substitution von Pullulan entsprechend den Erwartungen verläuft.

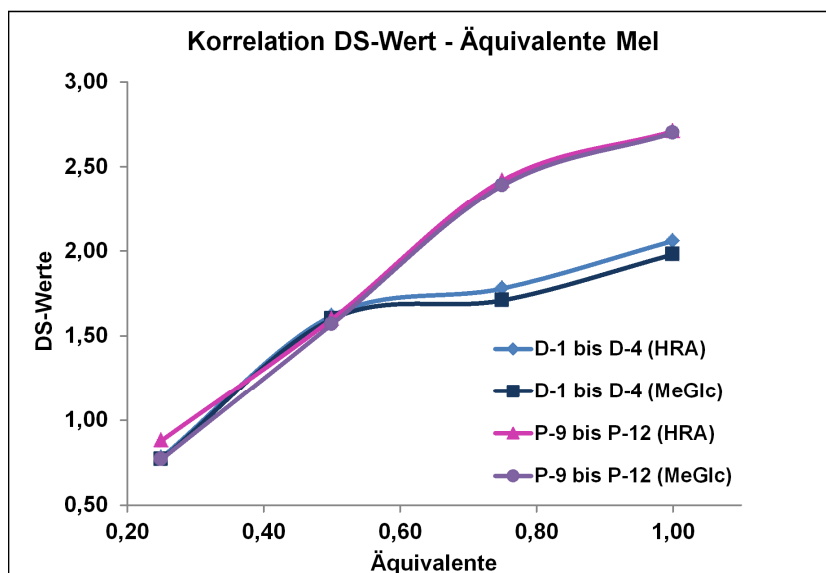


Abb. 3.9: Vergleich der DS-Werte bestimmt aus Meglc/OTMS bzw. Alditolacetaten (HRA) von methylierten Dextranen (D-1 bis D-4) und Pullulanen (P-9 bis P-12), Reaktionsbedingungen siehe Tab. 3.1).

Bezüglich der Reaktivität lässt sich eine Bevorzugung der einzelnen Positionen bei der Alkylierung von Dextranen von  $O-2 > O-4 \geq O-3$  und von  $O-2 \gg O-3 > O-6 > O-4$  für die entsprechenden Alkylpullulane erkennen (vergleiche 11.1). Allyldextrane zeigten die gleiche Tendenz.<sup>[117]</sup> Die Ergebnisse dieser Arbeit harmonisieren ebenfalls mit den Ergebnissen zur Substituentenverteilung in *O*-(2-Hydroxyethyl)-dextranen von De Belder

et al. Dort wurde ein 70 kDa Dextran in wässriger Lösung mit 0,25 % Natriumhydroxid mit Ethylenoxid bei 40 °C umgesetzt.<sup>[118]</sup> Die Regioselektivität der Methyl-Substitution von Glucanen zeigt sich an den partiellen DS-Werten  $x_i$ , die in der Reihenfolge  $x_2 > x_4 \geq x_3$  für die Dextranderivate vorliegen. Bei der Methylierung von Pullulan, welches aus  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) verknüpften Maltotrioseeinheiten besteht und somit ein Verhältnis von 6-OH zu 4-OH von 2 : 1 aufweist, zeigt sich eine Regioselektivität von  $x_2 > x_3 > x_6 > x_4$  (vergleiche Kapitel 1.1 und 1.3).

Um die analytischen Ergebnisse beurteilen zu können, wird die Abweichung von statistischen Modellen betrachtet. In den unten gezeigten Abbildungen 3.10 und 3.11 sind die Unterschiede zum statistischen Modell für die Versuchsansätze D-1 bis D-4 im Vergleich zu den Methylierungsansätzen von Pullulan (P-9 bis P-12) dargestellt. Links sind die Abweichungen der einzelnen Substitutionsfraktionen (un- ( $c_0$ ), mono- ( $c_1$ ), di- ( $c_2$ ) und tri- ( $c_3$ )) und rechts die Abweichungen der Monomerverteilungen  $s_i$  vom statistischen Modell gezeigt.

Für die statistische Auswertung des Substitutionsmusters in Dextranen werden die Anteile, der in Position 6 alkylierten Monomere zu den entsprechenden 6-OH-Derivaten addiert (d.h. die terminale Einheit wird vernachlässigt). So wird 6-O-Alkyl-glc zum unsubstituierten Monomer, 2,3,6-Tri-O-Alkyl- zu 2,3-Di-O-Alkylderivaten addiert etc. Damit wird die Alkylierung in Position 6 (Kettenende) nicht berücksichtigt. Der Quotient  $n$  ist bei Dextranen 8 und bei Pullulan 12. Durch dieses Vorgehen ergeben sich zwei DS-Werte, zum einen der Wert aus allen 13 Mustern, der den mittleren Gesamt-DS-Wert darstellt (DS oder DS<sub>ges</sub>) und zum anderen den niedrigeren DS-Wert ohne terminale 6-O-Substitution, der aus der  $x_{6,i}$  zu  $x_i$  Addition (= DS<sub>o6</sub>) entsteht.

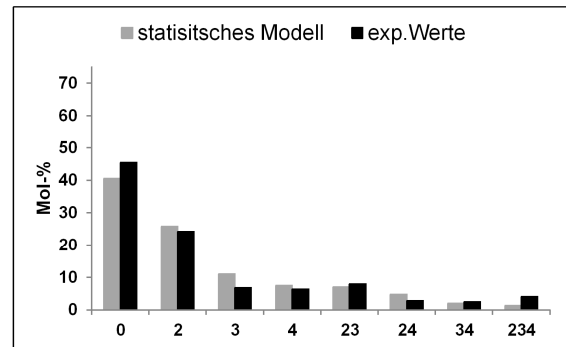
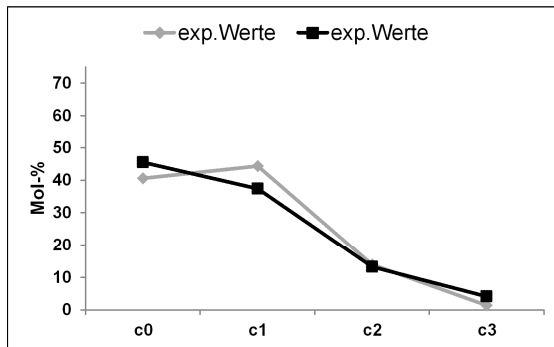
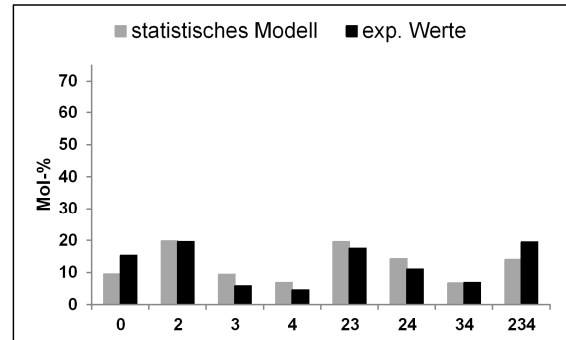
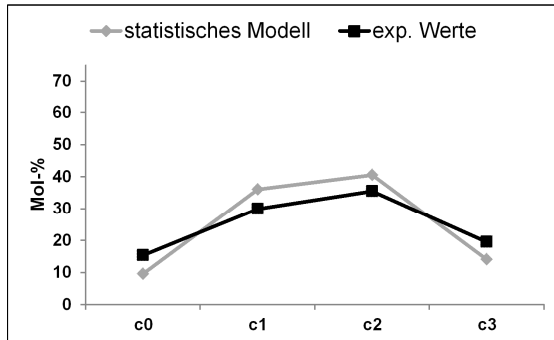
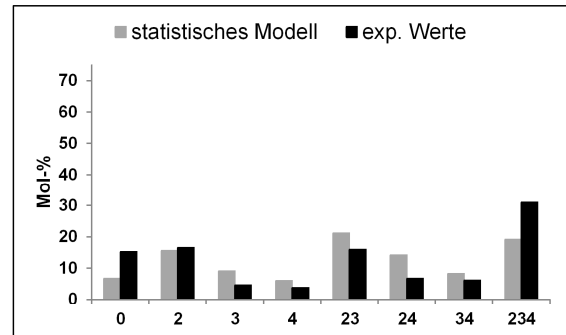
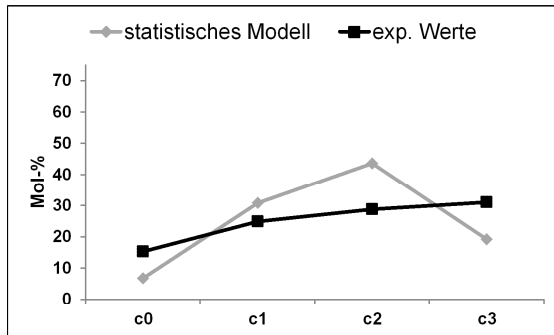
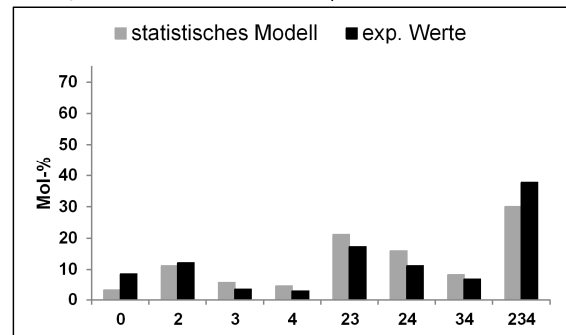
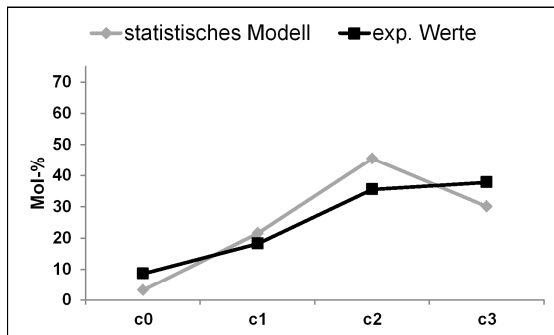
D-1: HRA, DS = 0,76 (0,25 eq. Li-Dimsyl, 0,28 eq. Mel),  $H_1 = 0,97$ D-2: HRA, DS = 1,59 (0,50 eq. Li-Dimsyl, 0,60 eq. Mel),  $H_1 = 1,22$ D-3: HRA, DS = 1,75 (0,75 eq. Li-Dimsyl, 0,90 eq. Mel),  $H_1 = 2,27$ D-4: HRA, DS = 2,03 (1,00 eq. Li-Dimsyl, 1,20 eq. Mel),  $H_1 = 1,47$ 

Abb. 3.10: Experimentell bestimmte Substituentenverteilung in den Glucosyleinheiten der Methyl-dextrane D-1 bis D-4 (schwarz) im Vergleich zu einer zufälligen Verteilung (grau). Reaktionsbedingungen siehe Tab. 3.1.

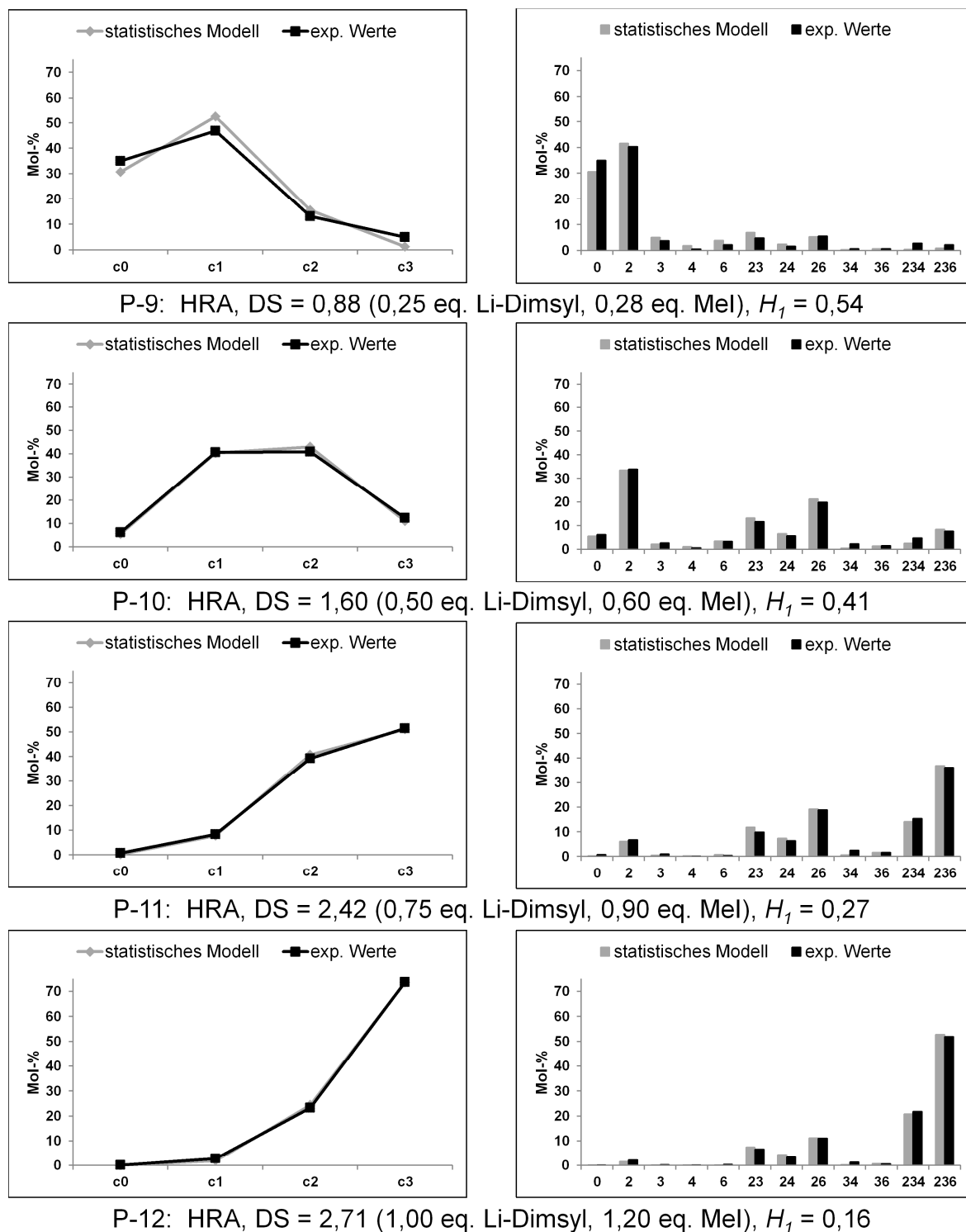


Abb. 3.11: Experimentell bestimmte Substituentenverteilung in den Glucosyleinheiten der Methylpullulane P-9 bis P-12 (schwarz) im Vergleich zu einer zufälligen Verteilung (grau). Reaktionsbedingungen siehe Tab. 3.1.

Bei den Methylierungen D-1 bis D-4 sind die  $c_0$  und  $c_3$  Werte im Vergleich zur random-Verteilung erhöht und die  $c_1$  und  $c_2$  Werte erniedrigt. Die Abweichungen bei den Methylpullulanen liegen im Rahmen der Messungenauigkeit. Unter Berücksichtigung der strukturellen Unterschiede von Dextran und Pullulan, zeigen sich für die Substituentenverteilung in den Glucosyleinheiten der Methyl-dextrane deutlich höhere Heterogenitäten.

Bei den Ethylierungen werden bei gleichen Reagenzäquivalenten deutlich geringere DS-Werte als bei den Methylierungen gefunden, was auf die größere sterische Hinderung beim nucleophilen Angriff zurückgeführt werden kann.

In den folgenden Graphen (Abb. 3.12 und 3.13) sind die Abweichungen der einzelnen Molfraktionen  $c_i$  und die der Monomerverteilungen vom statistischen Modell dargestellt. Sowohl beim Pullulan als auch beim Dextran sind die un- und trisubstituierten Fraktionen gegenüber dem statistischen Modell erhöht, während die mono- und disubstituierten Anteile entsprechend erniedrigt sind.

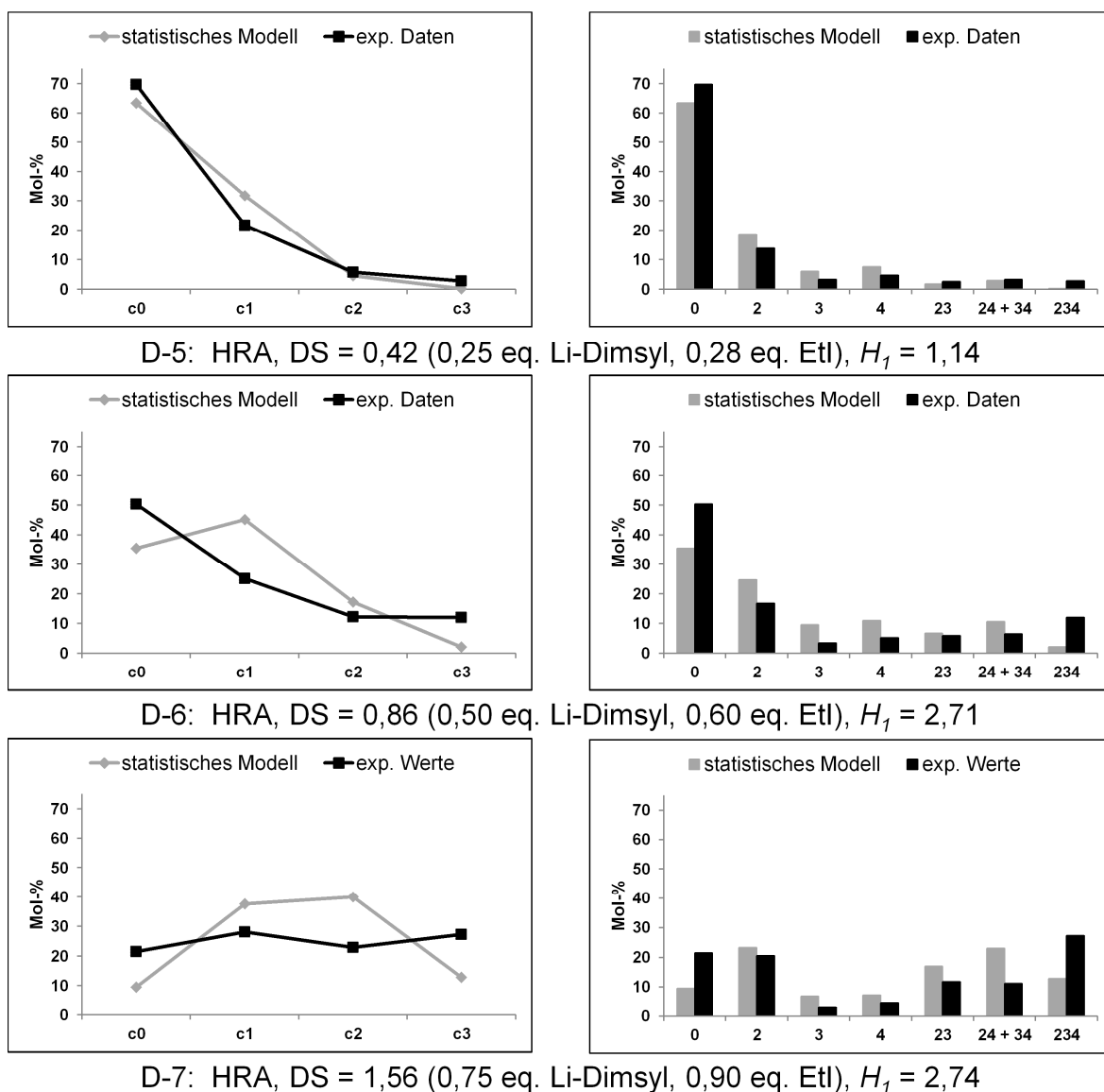


Abb. 3.12: Experimentell bestimmte Substituentenverteilung in den Glucosyleinheiten von Ethyl-dextran (schwarz) im Vergleich zu einer zufälligen Verteilung (grau). Reaktionsbedingungen siehe Tab. 3.1.

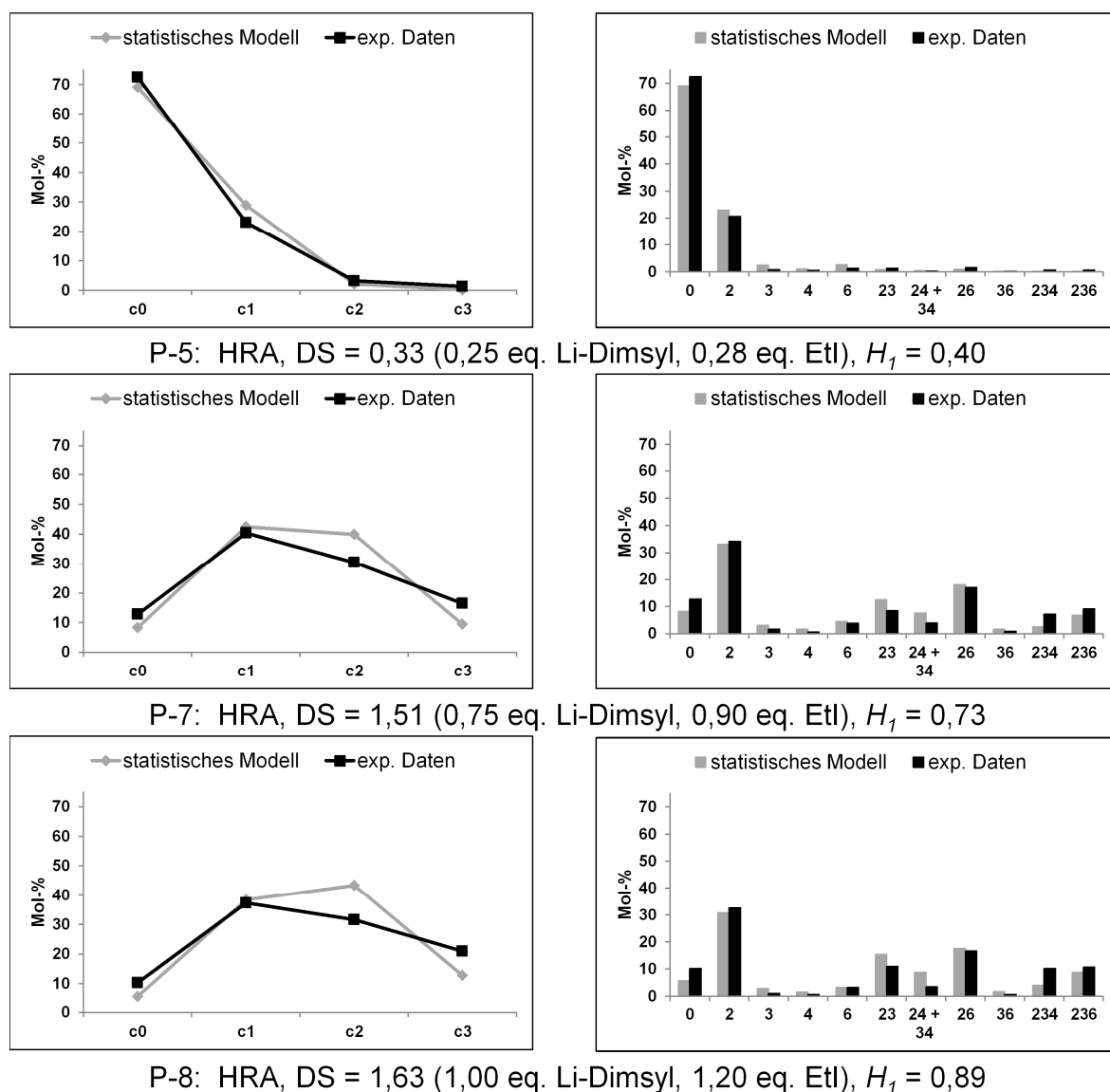


Abb. 3.13: Experimentell bestimmte Substituentenverteilung in den Glucosyleinheiten von Ethylpullulan (schwarz) im Vergleich zu einer zufälligen Verteilung (grau). Reaktionsbedingungen siehe Tab. 3.1.

Das unterschiedliche Reaktionsverhalten von Pullulanen und Dextranen kann durch die strukturellen Unterschiede, die zu einem anderen Lösungsverhalten führen, begründet werden. Die Gestalt sowie der strukturelle Aufbau der Moleküle sind zudem für den Verlauf der Deprotonierung wichtig. Wie bei der Methylierung von Dextran im Vergleich zu Pullulanen (D-1 bis D-4 im vgl. zu P-9 bis P-12) ist es ein großer Unterschied, ob es sich um ein aufgeweitetes Knäul, oder hochverzweigte, dichte Strukturen, bei denen nicht alle Bereiche gleich gut zugänglich sind, handelt. Durch Lichtstreuexperimente sowie Untersuchungen zur Viskosität können Rückschlüsse auf den Lösungszustand von Glucanen gezogen werden. Von Rolland-Sabaté sowie Bruchard und Mitarbeitern wurde eine hohe Dichte von Dextranmolekülen (in halbverdünnten Lösungen) anhand von Lichtstreuexperimenten beschrieben, die mit steigendem Molekulargewicht zunimmt.<sup>[38,119]</sup>



Das lineare, unverzweigte Pullulan ist zugänglicher als ein verzweigtes Dextran, wo mit fortschreitender Substitution die sterische Hinderung immer weiter steigt.

Bei den durchgeführten Alkylierungen muss zudem der Einfluss des Lösungsmittels DMSO beachtet werden. Es handelt sich um ein viskoses Lösungsmittel mit einer niedrigen Erstarrungstemperatur von nur 18 °C. Daher können die Umgebungsparameter großen Einfluss auf den Verlauf der Reaktion haben. Als Lösungsmittel für Alkylierungsreaktionen von Polysacchariden wird DMSO als Standardlösungsmittel, gerade bei Permethylierungen, eingesetzt. Bei Verwendung von Li-Dimsyl ergibt sie sich zwangsläufig. In DMSO werden Kationen, wie  $H^+$ ,  $Na^+$  oder  $K^+$  solvatisiert, Anionen jedoch nicht, diese können darum besonders gut angegriffen werden. Der Einfluss von DMSO auf Pullulan und Dextran sollte jedoch gleich sein.

Abweichungen vom statistischen Modell können durch eine Inhomogenität des Materials selbst verursacht werden, wenn z.B. bestimmte Molekülbereiche schlechter aktiviert sind. Ist die Reaktivität durch die Erstsitution an der Glucoseeinheit gesteigert, verlaufen die weiteren Reaktionen an den anderen Positionen an dieser Monomereinheit ebenfalls schneller als im Rest des Moleküls. Zudem ist eine gleichmäßige Aktivierung des Polymers für eine statistische Substitution unabdingbar.

Wird bei Alkylierungsreaktionen NaOH als Base eingesetzt, sind Abweichungen vom statistischen Modell und höhere Heterogenitäten aufgrund des Deprotonierungsvorgangs direkt an der Oberfläche der NaOH-Partikel zu erwarten (vergleiche Abschnitt 3.1.2). Bei einem homogenen Reaktionssystem, wie es in den obigen Ansätzen vorliegt, wird eigentlich damit gerechnet, dass durch Li-Dimsyl als Base eine, an allen Teilen des Moleküls gleichmäßig auftretende Deprotonierung und folglich geringe Heterogenitäten auftreten. Die hohen Heterogenitäten bei den Alkylierungen von Dextranen sind daher unerwartet. Ein Erklärungsansatz für die gegenüber dem statistischen Modell erhöhten experimentellen  $c_0$  und  $c_3$  Werte könnte die Ausbildung einer negativ geladenen, äußeren „Schale“ infolge einer schnellen Deprotonierung durch Li-Dimsyl an der Peripherie von Dextranmolekülen oder -clustern sein, wodurch die inneren Bereiche der Glucane aufgrund der hyperververzweigten Struktur des recht dichten Dextrans gegen Angriffe der Base abgeschirmt wären (elektrostatische Abschirmung). Eine geringere Alkylierung wäre die Folge und der Methylierungsgrad würde von außen nach innen abnehmen. Eine Heterogenität zweiter Ordnung (über das Polymermolekül) der Substituentenverteilung wäre somit gegeben.<sup>[49]</sup> Liegen die Dextranmoleküle nicht molekulardispers, sondern wie von Burchard gezeigt, im Gleichgewicht mit Clustern aus mehreren Molekülen vor, würde eine Heterogenität erster Ordnung (über das Material) resultieren.<sup>[120]</sup> Ein Hinweis für einen solchen „Shielding-effect“ könnte die beobachtete Gelbildung beim Zutropfen der Base sein. In Abb. 3.14 ist dieser Vorgang für ein

einzelnes Dextranmolekül schematisch dargestellt. Da solche Effekte bei der Methylierung von löslichen Polysacchariden mit Li-Dimsyl/Mel bisher nicht beobachtet wurden, kann die Ursache nur in der Lösungsstruktur und damit verbunden der Zugänglichkeit der Dextransketten liegen.

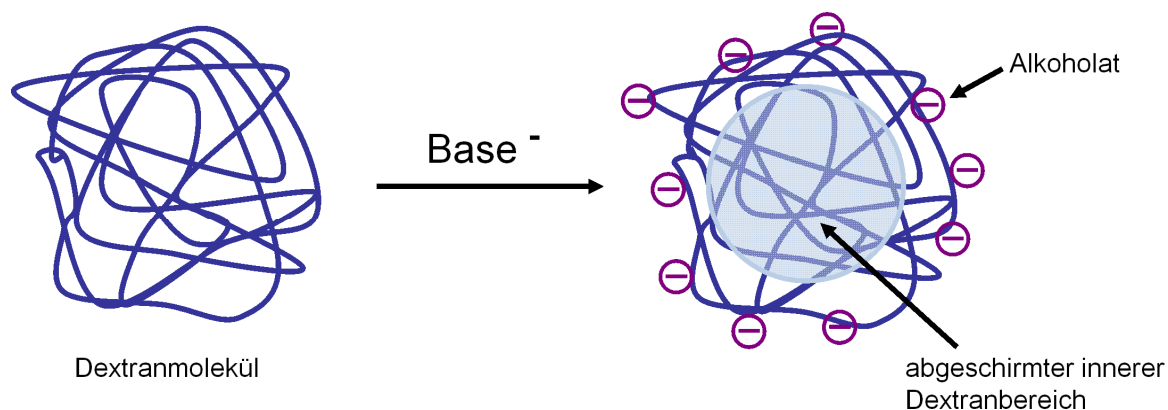


Abb. 3.14: Modell des Shielding-effects, bei der Deprotonierung von Dextran mit Li-dimsyl.

Neben der Verteilung innerhalb eines Polymerbausteins, ist auch die Substituentenverteilung entlang der Polymerketten eine interessante Fragestellung. Einflüsse, wie die Nachbargruppeneffekte zwischen den verknüpften Einheiten, intermonomere Effekte, aber auch übermolekulare (topochemische) Einflüsse treten hier hervor und können der Grund für eine auftretende Heterogenität im Material sein. Da keine Steigerung bei der Reaktion von vicinalen Hydroxylgruppen bei der *O*-Methylierung von Glucose berichtet wurde,<sup>[75]</sup> wird angenommen, dass die Abweichung von statistischen Verteilungen mit einer heterogenen Verteilung auf der nächsten strukturellen Hierarchieebene, also einem DS-Gradienten in und über das Glucanmolekül vorliegt. Dies konnte durch ESI-MS-Messungen von perdeuteromethylierten und partiell depolymerisierten Methyl Dextranen (Hydrolyse mit 2 M TFA, 10 min bei 150 °C) durch Vollmer et al. nachgewiesen werden. Die quantitative Analyse der Oligosaccharidgemische ergab einen hohen Anteil terminaler Substituenten, also der Seitenketten. Hierbei wurde bedacht, dass die 3-*O*-Glucosidbindung (also die Verzweigungspunkte) vergleichsweise schnell gespalten wird. Die Verteilung der Methylgruppen bei DP 2 und DP 3 zeigte die Fortsetzung des auf der Monomerebene beobachteten Trends auch auf der makromolekularen Ebene. Der Anteil unsubstituierter Fragmente war, unabhängig vom DP, größer als für die aus den GC-Monomerdaten berechnete statistische Verteilung. Dies wurde als ein Hinweis für das Vorhandensein von ausgedehnten unsubstituierten Bereichen in der Glucankette bzw. niedrig substituierten Dextranmoleküle gedeutet. Eine weitere Substitution erfolgte zudem bevorzugt in bereits niedrig „vor“-substituierten Bereichen.<sup>[49]</sup> Die ungewöhnliche Heterogenität von Methyl Dextranen kann strukturell durch die Langkettenverzweigung (1 bis 2 %) des Moleküls bedingt sein, auch nimmt mit steigendem Molekulargewicht der Grad der Verzweigung und damit der „hyperbranched“-Charakter sowie die Dichte der

Moleküle zu.<sup>[38]</sup> Der Verzweigungsgrad und dadurch bedingt der Solvatationszustand oder der „katalysierende“ Einfluss einer Erstsitution in der Glucosyleinheit sind Parameter, die Abweichungen von statistischen Modellen erklären könnten. Die Größe des Polysaccharids sollte aufgrund des Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnisses einen entscheidenden Einfluss auf die Heterogenität zeigen. Auch die Baseneinwirkzeit kann Aufschlüsse über Art und Einfluss der Deprotonierung geben. Das soll im Folgenden als Experiment zur Überprüfung der Hypothese über die Ausbildung eines Shield-effects entwickelt werden.

### 3.1.6 Alkylierung mit unterschiedlicher Baseneinwirkzeit

Bei dieser Serie von Versuchsansätzen wurde der Einfluss der Basenwirkzeit auf die Alkylierung überprüft. Die Synthesen tragen die Bezeichnungen D-14 bis 17 und sind mit den Reaktionsbedingungen in Tabelle 3.2 aufgeführt. Das Ziel dieser Versuche war es die Modellvorstellung der Deprotonierung zu überprüfen. Hierbei wird angenommen, dass die Dextrane in der Peripherie von der Base schnell deprotoniert werden und das Dimsyl-Anion dann nur langsam durch die negativ geladene Hülle des entstandenen Polyanions diffundieren kann. Diese Modellvorstellung ließe erwarten, dass der Effekt der starken Heterogenität umso ausgeprägter sein sollte, je kürzer die Baseneinwirkzeit ist. Im Vergleich zu den vorherigen Versuchen wurden ein höhermolekulares Dextran (500 kDa) eingesetzt, da sich hier ein Shielding-effect am stärksten meisten auswirken sollte.

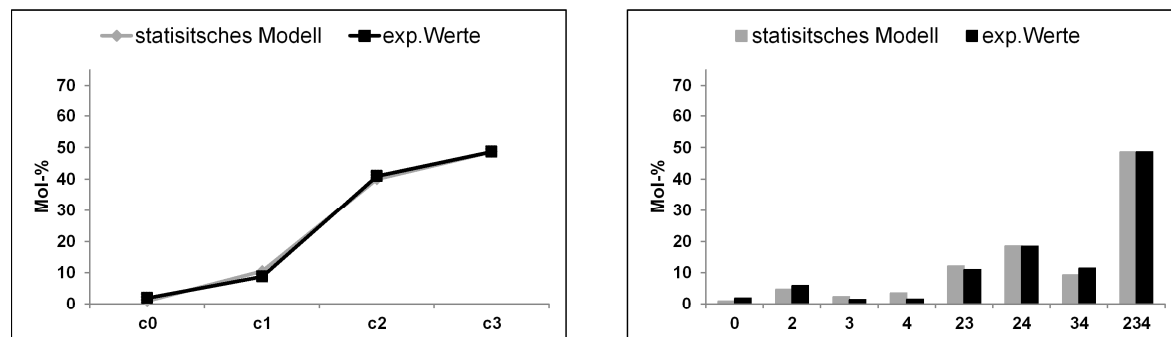
*Tabelle 3.2: Reaktionsbedingungen der Alkylierungsansätze D-14 bis D-17, Variation der Baseneinwirkzeit mit 1 eq Li-Dimsyl/OH-Gruppe, 24 h Reaktionszeit nach Zusatz von und 1,5 eq Mel/OH-Gruppe, 10%ige-Lösung des Polysaccharids (500 kDa) in DMSO.*

Ansatz	Basen-	DS-Wert						E	A
	Einwirkzeit <sup>a</sup> [min]	HRA	Meglc/OTMS						
		DS <sub>ges</sub>	DS <sub>o6</sub> <sup>b</sup>	H <sub>1</sub>	DS <sub>ges</sub>	DS <sub>o6</sub> <sup>b</sup>	H <sub>1</sub>		
D-14	3	2,38	2,35	0,82	2,31	2,27	1,35	102	115
D-15	30	2,41	2,36	0,51	2,56	2,52	0,72	101	99
D-16	300	2,46	2,42	0,48	2,56	2,52	0,81	99	104
D-17	1500	2,37	2,33	1,06	2,35	2,32	1,78	103	102

<sup>a</sup> vor Alkylierungsmittelzugabe, <sup>b</sup> DS ohne terminale 6-O-Substitution, aus  $x_{6,i}$  zu  $x_i$  Addition.

Trotz unterschiedlicher Einwirkzeit der Base zeigen die DS-Werte im Rahmen der Messungenauigkeit keine signifikanten Unterschiede. Sie liegen im Bereich von 2,37 bis 2,46 für die Alditolacetate und von 2,31 bis 2,56 für die Meglc/OTMS-Derivatisierungen. Die Berechnung der DS-basierten Ausbeute lag im Bereich von 54 - 63 %. Wurde eine Dauer von 1500 min Baseneinwirkzeit vor der Mel Zugabe gewählt, so sinkt der DS-Wert wieder ab. Dies kann ein Zeichen dafür sein, dass das Polyanion allmählich wieder reprotoniert wird, z.B. durch eindringende Feuchtigkeit in das Reaktionssystem. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Dextranalkylierungen sind die Heterogenitäten der Versuchsreihe D-14 bis D-17 in der die Baseneinwirkzeit von 3 bis 1500 min variiert wurde, gering. In Abb. 3.15 wird beispielhaft für diese Versuchsreihe die Substituenten-

verteilung von Ansatz D-15 im Vergleich zum statistischen Modell gezeigt. Die experimentellen Werte und die für eine statistische Verteilung von un- bis trisubstituierten Glucaneinheiten stimmen gut überein. Es liegen hochalkylierte Produkte vor, sodass die Berechnung der Heterogenität kleine Werte ergibt.



D-15: HRA, DS = 2,36 (1,00 eq. Li-Dimsyl für 30 min, 1,50 eq. Mel),  $H_1 = 0,51$

Abb. 3.15: Experimentell bestimmte Substituentenverteilung in den Glucosyleinheiten von Methyl-dextran (D-15), Baseneinwirkzeit = 30 min im Vergleich zu einer zufälligen Verteilung (grau).

Für die praktische Durchführung lässt sich festhalten, dass für eine optimale Methylierung keine langen Baseneinwirkzeiten notwendig sind. Bereits 30 min nach der Basenzugabe kann, wenn möglichst hohe DS-Werte erzielt werden sollen, das Alkylierungsmittel zugegeben werden. Die Hypothese des „Schalenmodells“ lässt sich für die hier gewählten Bedingungen nicht beweisen. Die Alkylierung könnte mit dem 70 kDa Dextran, welches bei den Ansätzen D-1 bis D-7 verwendet wurde und mit geringeren Mengen an Base und Alkylierungsmittel wiederholt werden.

### 3.1.7 Alkylierung mit NaOH in Wasser

Die Synthesen tragen die Bezeichnung D-18 bis D-21 und sind in Tabelle 3.3 aufgeführt. Als polar protisches Lösungsmittel wurde Wasser und als Base NaOH eingesetzt. Bei dieser Vorgehensweise sind sowohl das Polysaccharid wie auch die Base gelöst, nur das Methyljodid nicht. Der Effekt dieses Lösungsmittels sollte mit einer Methylierung in DMSO verglichen werden. Bei den Ansätzen D-18 und D-19 wurde ein Dextran mit einer Molmasse von 70 kDa verwendet. Für die anderen beiden Synthesen wurden Dextran mit einer mittleren molaren Masse von 500 kDa benutzt. So kann das Verhalten von Dextranen mit unterschiedlicher Molmasse verglichen werden. 72 h nach der Alkylierungsmittelzugabe wurde eine Hälfte des Reaktionsgemisches entnommen und dialysiert. Nach insgesamt 144 h Reaktionsdauer wurde die Reaktion für das verbliebene Reaktionsgemisch beendet.

Tabelle 3.3: Reaktionsbedingungen der Methylierung von D-18 bis D-21, polar protisches Lösungsmittel (50 mL Wasser), Base (NaOH), Reaktionszeiten 72 h und 144 h in Wasser bei Raumtemperatur.

Ansatz	Zeit <sup>a</sup> [h]	Molmasse [kDa]	Base Eq/OH	RX Eq/OH	DS-Wert						E [mg]	A [mg]	Ausbeute <sup>c</sup> [%]
					HRA		Meglc/OTMS						
					DS <sub>ges</sub>	DS <sub>o6</sub> <sup>b</sup>	H <sub>1</sub>	DS <sub>ges</sub>	DS <sub>o6</sub> <sup>b</sup>	H <sub>1</sub>			
D-18-1	72	70	1	1,2	0,25	0,25	0,13	0,21	0,21	0,17	238	228	88
D-18-2	144				0,35	0,35	0,26	0,28	0,27	0,24	238	202	76
D-19-1	72	70	2	2,4	0,40	0,40	0,41	0,34	0,33	0,33	234	207	78
D-19-2	144				0,61	0,61	0,26	0,45	0,45	0,43	234	247	88
D-20-1	72	500	1	1,2	0,28	0,28	0,20	0,19	0,19	0,13	239	204	78
D-20-2	144				0,32	0,32	0,25	0,27	0,26	0,21	239	244	92
D-21-1	72	500	2	2,4	0,45	0,45	0,29	0,35	0,35	0,38	239	217	79
D-21-2	144				0,60	0,59	0,44	0,46	0,46	0,65	239	255	89

<sup>a</sup> Reaktionszeit mit Alkylierungsmittel, <sup>b</sup> DS ohne terminale 6-O-Substitution, aus  $x_{6,i}$  zu  $x_i$  Addition, <sup>c</sup> DS-basierte Berechnung der Ausbeute mit DS<sub>ges</sub> HRA.

Wie in Abb. 3.16 gezeigt, sind die im Reaktionssystem Wasser/NaOH/Mel generierten DS-Werte vergleichsweise gering. Die Verdopplung der Reaktionszeit von 72 h auf 144 h hatte einen leichten Anstieg des DS-Wertes zur Folge (Tabelle 3.3). Durch die Verdopplung der Basen- und Methyljodidäquivalente in den Ansätzen D-19 und D-21 gegenüber D-18 und D-20 konnte der DS-Wert um 60 % (72 h) und 80 % (144 h) gesteigert werden. Vergleichend zeigt sich, dass die Molmasse keinen signifikanten Einfluss auf das Ausmaß der Methylierung hatte. Das Substitutionsmuster weist keine Abweichungen von statistischen Modellen auf.

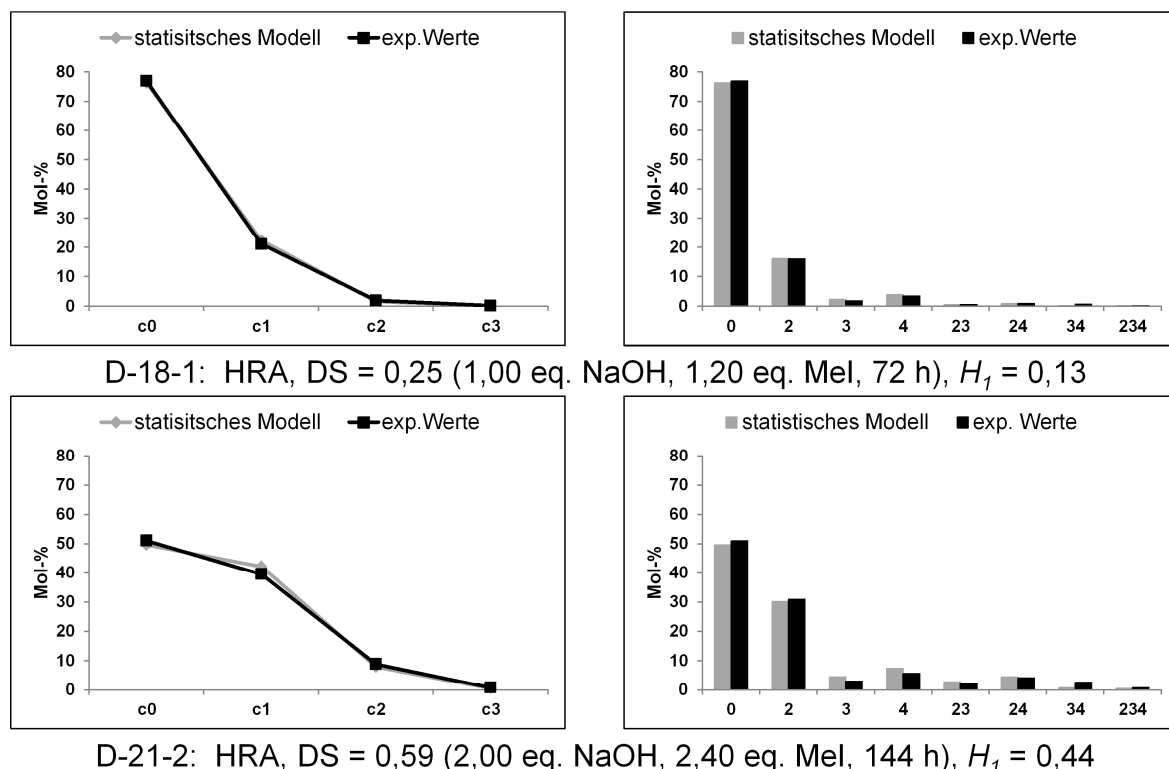


Abb. 3.16: Experimentell bestimmte Substituentenverteilung in den Glucosyleinheiten von Methyl-dextranen (D-18-1, 70 kDa) und (D-21-2, 70 kDa) im Vergleich zu einer zufälligen Verteilung (grau).

In dem vorgestellten System (NaOH/Mel/Wasser) ist (im Rahmen der Messgenauigkeit) eine statistische Verteilung der eingeführten Methylgruppen zu beobachten. Die Deprotonierung sollte schnell und reversibel erfolgen, sodass sich ein pH-Wert abhängiges Gleichgewicht einstellen kann. Der nucleophile Angriff auf Mel sollte vergleichsweise langsam erfolgen, da die Solvathülle die Nucleophile der Alkoholationen stark herabsetzt. Als Folge findet eine statistische Substitution der Hydroxylgruppen statt. Der geringe DS-Zuwachs in der zweiten Hälfte der Reaktionszeit könnte durch die Nebenreaktion von NaOH mit Mel zu Natriumiodid und Methanol bedingt sein. Dadurch wird Base verbraucht und Mel wird hydrolysiert. Eine Verbesserung wäre die Einstellung eines konstanten pH-Wertes (weitere NaOH-Zugabe) und nachfolgende Zugabe von Mel während der Reaktion.

Als Fazit ist festzuhalten, dass die Methylierung in einem System aus Wasser mit NaOH als Base, trotz der Zweiphasigkeit in Bezug auf Mel zu statistisch substituierten Produkten führt. Die Reaktion verläuft jedoch im Vergleich zum aprotischen Lösungsmittel (DMSO) in Wasser sehr langsam, sodass vergleichsweise gering substituierte Produkte entstanden. Dies entspricht dem bekannten Einfluss des Lösungsmittels auf die Geschwindigkeit von  $S_N2$ -Reaktionen.

Durch Energiezufuhr, (z.B. Temperaturerhöhung), die Verwendung von Reagenzien, die einen Phasentransfer ermöglichen oder durch den Einsatz eines stärkeren Alkylierungsmittels (z.B. Dimethylsulfat), könnte der Umsatz gesteigert werden.

## 4 Cyanoethylglucane

Im folgenden Kapitel wird die Cyanoethylierung von Polyglucanen beschrieben. Verschiedene Reaktionsmechanismen und deren Vor- und Nachteile werden diskutiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind zum Teil veröffentlicht.<sup>[121]</sup>

### 4.1 Cyanoethylierung von Polysacchariden

Bei einer Cyanoethylierung von Polysacchariden nach dem Reaktionsmechanismus der Michael-Addition erfolgt eine reversible, nucleophile Addition der Hydroxylgruppen eines Polysaccharids an die Doppelbindung des Acrylnitrils. Diese Reaktion ist thermodynamisch kontrolliert und sollte ein Substituentenverteilungsmuster entsprechend den relativen Stabilitäten ergeben. Damit entsteht ein von kinetisch kontrollierten Reaktionen abweichendes Substitutionsmuster. Die eingesetzte Base (NaOH) wirkt hierbei als Katalysator, indem sie die Deprotonierung der Hydroxylgruppen initiiert. Die elektronenziehende Wirkung der Nitrilgruppe aktiviert die Doppelbindung des Acrylnitrils und die Addition kann, wie in Abb. 4.1 gezeigt durch die Alkoholatgruppen erfolgen. Es entsteht ein Carbanion, welches durch die Konjugation des freien Elektronenpaares mit der Cyanoethylgruppe stabilisiert wird. Durch anschließende Protonierung liegt am Ende der Reaktion der Cyanoethylrest vor und die Base wird regeneriert.

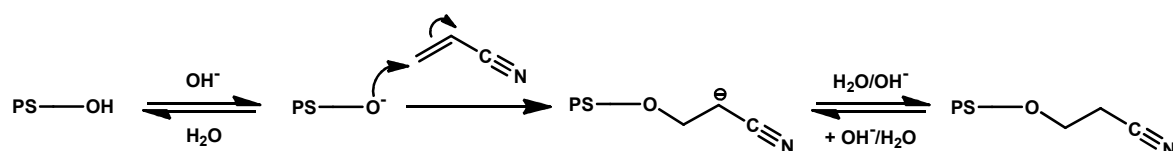


Abb. 4.1: Cyanoethylierung, Michael-Addition von Glucanen an Acrylnitril.

Als Nebenprodukt kann 1-Hydroxy-2-cyanoethan entstehen, da die Hydroxydionen mit dem Kohlenhydratalkoholat konkurrieren können. Dieses Nebenprodukt kann dann, wie in Abb. 4.2 dargestellt weitere Additionsprodukte wie Cyanodiethylether bilden. Durch diese Konkurrenzreaktion wird die Reagenzeffizienz gesenkt. Es ist deshalb erstrebenswert, mit möglichst geringen Mengen an Base und Wasser zu arbeiten.

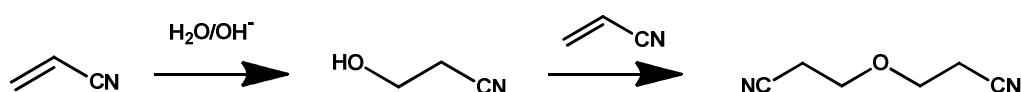


Abb. 4.2: Nebenreaktionen von Acrylnitril mit NaOH/Wasser, Bildung von 1-Hydroxy-2-cyanoethan mit anschließender Etherbildung.



Erfolgt wie in Abb. 4.3 die Hydrolyse der Cyanoethylgruppe, könnten als weitere Nebenprodukte Amide oder Carboxylate entstehen. Das Auftreten dieser funktionellen Gruppen wäre bei ausreichender Konzentration in IR-Spektren erkennbar.

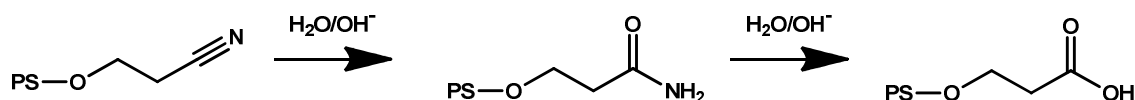


Abb. 4.3: Mögliche Nebenreaktionen bei der Michael-Addition von Acrylnitril, Bildung von Amid- und Carboxylgruppen.

Bei der Cyanoethylierung von Stärke wurden als Nebenprodukte Carbamoylethylstärke und Carboxyethylstärke bei höheren Reaktionstemperaturen von 50 - 60 °C beschrieben.<sup>[122]</sup> Durch Rückreaktion ( $\beta$ -Eliminierung) könnten ebenfalls Cyanoethylsubstituenten verloren gehen. Daher ist auch die Reaktionsdauer zu begrenzen.

Die Michael-Addition mit Acrylnitril wurde bereits erfolgreich in einigen Arbeiten genutzt, um Polysaccharide mit Cyanogruppen zu modifizieren. So synthetisierten Gianni et al. Cyanoethyl-Scleroglucane in wässriger Natronlauge.<sup>[123]</sup>

Die Cyanoethylierung von Cellulose wurde von Volkert und Wagenknecht umfassend untersucht.<sup>[124]</sup> Die Produktcharakterisierung erfolgte hier mittels NMR-Spektroskopie. In der Patentvorschrift von Onda wurden Cyanoethylpullulane mit DS-Werten von bis zu 2,71 erreicht.<sup>[65]</sup> Die Synthese und Derivatisierung von Aminopropylcellulose über Cyanoethylgruppen als Zwischenstufen wurde 1984 von Daly beschrieben.<sup>[125]</sup> Von Verraest et al. stammen Beiträge zur Synthese von Cyanoethyl-Inulinen und der Reduktion zu den entsprechenden Aminopropylderivaten mit  $\text{NaBH}_4$ /Cobaltborid. Die erreichten DS-Werte für Cyanoethylinulin lagen bei 0,2 - 1,6 mit einer Umsetzung von bis zu 90 %. Die Produktcharakterisierung erfolgte in diesen Arbeiten mittels NMR-Spektroskopie und Gelpermeationschromatographie.<sup>[63,64,126]</sup>

Gonera optimierte diese Strategie erfolgreich für die Synthese von Aminopropylstärke und -amylose. Die Produkte wurden z.B. für die Stabilisierung von Enzymen (Horseradish Peroxidase) genutzt. Es wurden Ausbeuten bis 98 % erreicht und der höchste  $\text{DS}_{\text{CE}}$ -Wert lag bei 0,67.<sup>[56,127,128]</sup> Durch Cuber wurde diese Methode, im Rahmen einer Diplomarbeit genutzt, um Cyanoethyl- und Aminopropyldextrane herzustellen. Hier wurden  $\text{DS}_{\text{CE}}$ -Werte von 0,20 bis 1,51 mit einer Reaktionseffizienz von 52 % erzielt.<sup>[129]</sup>

In der vorliegenden Arbeit sollen die bisherigen Synthesen weiter verbessert und auf Dextran wie auf Pullulan angewandt werden. Ein möglichst breites Spektrum an DS-Werten wird angestrebt. Die Bildung von Nebenprodukten, bzw. ein möglicher Substituentenverlust wird mittels IR- und NMR-Spektroskopie überprüft. Die Cyanoethylglucane dienen dann zur Synthese von Nanopartikeln und vor allem als Vorstufe für die

Aminofunktionalisierung. Für die durchgeführten Cyanoethylierungen mit geringem bis mittlerem Substitutionsgrad wurden 300 mg bis 6 g Polysaccharid in 1 - 20 mL Wasser (= 30%ige Polysaccharidlösungen) gelöst und mit 0,2 bis 1 eq NaOH/AGU versetzt. Acrylnitril wurde von 1 bis 10 eq/AGU zugesetzt. Die Reaktionsdauer betrug 30 min bei 45 °C. Für einen hohen Cyanoethylierungsgrad wurde die Reaktion in Anlehnung an Onda<sup>[65]</sup> durchgeführt. Es wurden 2 eq Base/AGU und 23 eq Acrylnitril/AGU verwendet (siehe 10.3.2 sowie Tabelle 4.1). Acrylnitril diente hier sowohl als Reaktand sowie auch als Solvenz. Durch die Zugabe von Aceton, einem Lösungsmittel in dem sowohl die basische, wässrige Phase als auch das Alkylierungsmittel löslich sind, erfolgte ein besserer Stoffaustausch während der Reaktion, wodurch deutlich höhere DS-Werte erreicht werden konnten. Die Reaktionsdauer betrug in diesem Fall 24 h bei Raumtemperatur. Die Produktcharakterisierung erfolgte bei Onda mittels über IR-Spektroskopie und Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl. In diesen Arbeiten wurde ein Cyanoethylierungsgrad von bis zu 90 % (DS = 2,71) erreicht.<sup>[65]</sup>

*Tabelle 4.1: Reaktionsbedingungen der Cyanoethylierung von Dextran (6 kDa) und Pullulan (100 kDa) mit Acrylnitril und NaOH.*

<b>Ansatz</b>	<b>E</b>	<b>Wasser</b>	<b>Aceton</b>	<b>NaOH</b>	<b>Acrylnitril</b>			<b>A</b>
	<b>[g]</b>	<b>[mL]</b>	<b>[mL]</b>	<b>[mg]</b>	<b>eq/AGU</b>	<b>[μL]</b>	<b>eq/AGU</b>	<b>[g]</b>
<b>CED-1</b>	0,30	1	-	15	0,20	485	4	0,39
<b>CED-2</b>	0,30	1	-	15	0,20	728	6	0,38
<b>CED-3</b>	0,30	1	-	15	0,20	971	8	0,38
<b>CED-4</b>	0,30	1	-	15	0,20	1213	10	0,42
<b>CED-5</b>	1,20	4	-	60	0,20	1941	4	1,23
<b>CED-6</b>	0,50	5	4,75	250	2,00	4136	23	0,77
<b>CED-8</b>	1,20	4	-	60	0,20	1941	4	1,17
<b>CED-9</b>	1,20	4	1,00	60	0,20	1941	4	1,26
<b>CED-10</b>	0,50	5	4,75	250	2,00	4136	23	0,56
<b>CED-11</b>	0,30	1	-	15	0,20	485	4	0,23
<b>CED-12</b>	0,30	1	-	15	0,20	485	4	0,26
<b>CED-19</b>	1,20	4	-	250	3,34	1941	4	1,36
<b>CED-20</b>	6,00	20	-	300	0,20	9750	4	5,34
<b>CED-21</b>	1,00	10	9,30	500	2,00	8272	23	1,23
<b>CEP-9</b>	0,30	1	-	15	0,20	122	1	0,34
<b>CEP-11</b>	0,30	1	-	30	0,40	122	1	0,34
<b>CEP-12</b>	0,30	1	-	45	0,60	122	1	0,32
<b>CEP-13</b>	0,30	1	-	60	0,80	122	1	0,35
<b>CEP-14</b>	0,30	1	-	75	1,00	122	1	0,34
<b>CEP-15</b>	0,30	1	-	15	0,20	122	1	0,32
<b>CEP-16</b>	0,30	1	-	15	0,20	122	1	0,33
<b>CEP-17</b>	0,50		4,75	250	2,02	4653	23	0,71
<b>CEP-19</b>	1,20	4	-	60	0,20	1941	4	1,17
<b>CEP-20</b>	1,20	4	1,00	60	0,20	1941	4	1,29

Eine genaue gaschromatographische Analyse der Substituentenverteilung auf Monomerebene in cyanoethylierten Dextranen und Pullulan war bisher nicht veröffentlicht und soll in dieser Arbeit vorgestellt werden. Als Referenzmethoden zur DS-Bestimmung wurden Elementaranalysen und NMR-Spektren herangezogen. Durch den Einsatz von Pullulan und Dextran ist wieder die Möglichkeit gegeben, ein lineares mit einem verzweigten Polysaccharid zu vergleichen.

## 4.2 Charakterisierung von Cyanoethylglucanen

Für die strukturelle Charakterisierung von Cyanoethyl- und später auch Aminopropylglucanen wurden die in der Einleitung (siehe Abschnitt 1.3) vorgestellten Methoden angewandt. Im Folgenden werden nur Abweichungen und Besonderheiten erklärt.

### IR-Spektroskopie

In den Abbildungen 4.4 und 4.5 werden ATR-IR-Spektren der nativen Polysaccharide Dextran (6 kDa) und Pullulan (100 kDa) den daraus hergestellten Cyanoethylethern gegenübergestellt.

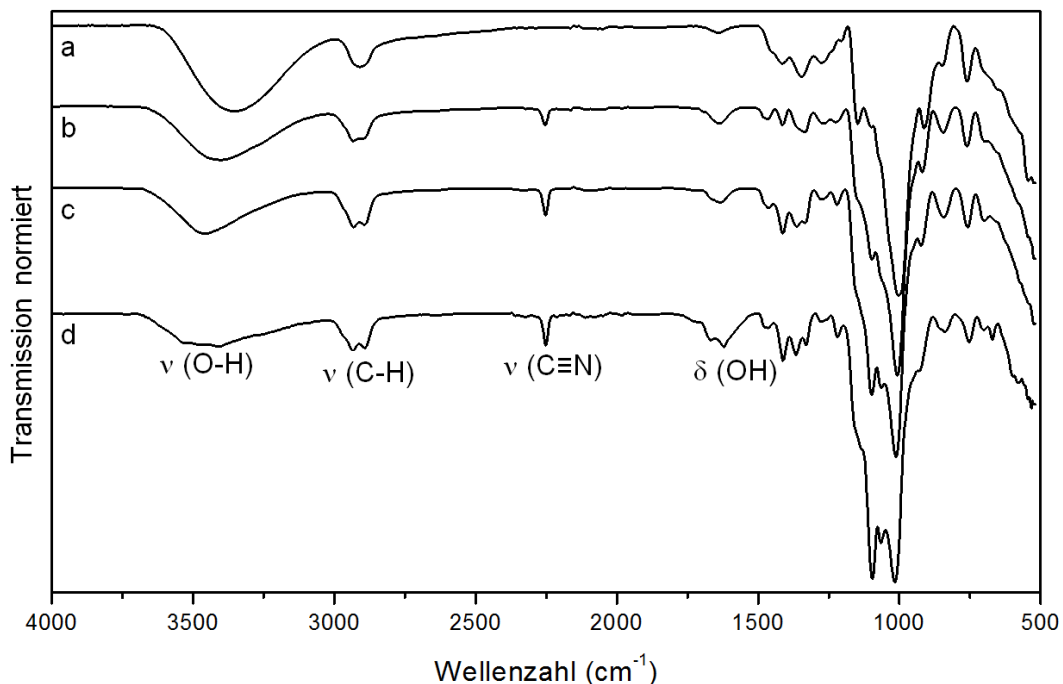


Abb. 4.4: ATR-IR-Spektren von (a) nativem Dextran (6 kDa) und den daraus hergestellten Cyanoethyldextranen (b) CED-5 ( $DS_{EA} = 0,86$ ), (c) CED-9 ( $DS_{EA} = 1,47$ ) und (d) CED-6 ( $DS_{EA} = 2,68$ ).

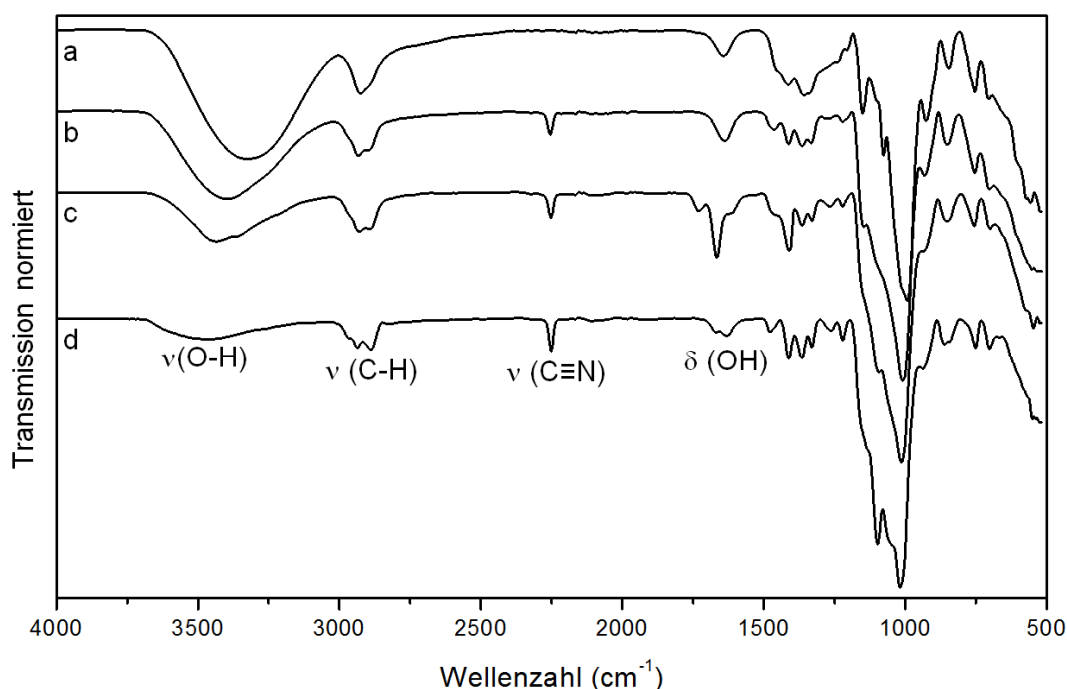


Abb. 4.5: ATR-IR-Spektren von (a) nativem Pullulan (100 kDa) und den daraus hergestellten Cyanoethyl-dextranen (b) CEP-19 ( $DS_{EA} = 0,90$ ), (c) CEP-20 ( $DS_{EA} = 1,36$ ) und CEP-17 ( $DS_{EA} = 2,36$ ).

Mittels ATR-IR-Spektroskopie können schnell Aussagen über die funktionellen Gruppen getroffen werden. Mit steigendem Substitutionsgrad nimmt die Intensität der Nitril-Bande bei einer Wellenzahl von  $2250\text{ cm}^{-1}$  (Valenzschwingung) zu, sodass auch quantitative Abschätzungen über das Ausmaß der Substitution möglich sind. Die charakteristischen Valenzschwingungen der OH-Gruppen der Polysaccharide ( $3300$  bis  $3400\text{ cm}^{-1}$ ) nehmen mit steigendem DS-Wert ab und das Maximum wird zu höheren Wellenzahlen verschoben (geringerer Anteil von Wasserstoffbrückenbindungen). Die Deformationsschwingung dieser funktionellen Gruppe liegt bei  $1635\text{ cm}^{-1}$ . Des Weiteren können die unspezifischen Banden der gesättigten CH-Valenzschwingungen bei den Wellenzahlen im Bereich von  $2935\text{ cm}^{-1}$  bis  $2893$  bzw. als Deformationsschwingung in Bereich von  $1400$  bis  $1460\text{ cm}^{-1}$  detektiert werden. Nebenprodukte der Cyanoethylierung, Hydrolyseprodukte der Nitrilgruppe, wie Amide oder Carboxylate, die charakteristische Wellenzahlen von  $1850$  bis  $1600\text{ cm}^{-1}$  bzw.  $1650$  bis  $1550\text{ cm}^{-1}$  aufweisen würden, konnten nicht, oder wenn nur in Spuren detektiert werden.

## NMR-Spektroskopie

Als weitere Methode zur Bestimmung des DS-Werts an intakten Polymeren soll die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie diskutiert werden. Hierzu wurden ca. 10 mg der einzelnen Cyanoethylpolysaccharide in deuterierten Lösungsmitteln gelöst und analysiert. Zumeist wurde  $\text{D}_2\text{O}$  verwendet. Waren die Cyanoethyl-derivate aufgrund eines hohen Substitu-

tionsgrades (ab  $DS > 2$ ) nicht mehr wasserlöslich, wurde auf  $DMSO-d_6$  zurückgegriffen. In Abb. 4.6 sind die  $^1H$ -NMR-Spektren der Probe CED-9 ( $DS_{NMR} = 1,81$ ) und CED-6 ( $DS_{NMR} = 2,37$ ) sowie das native Dextran (70 kDa) dargestellt.

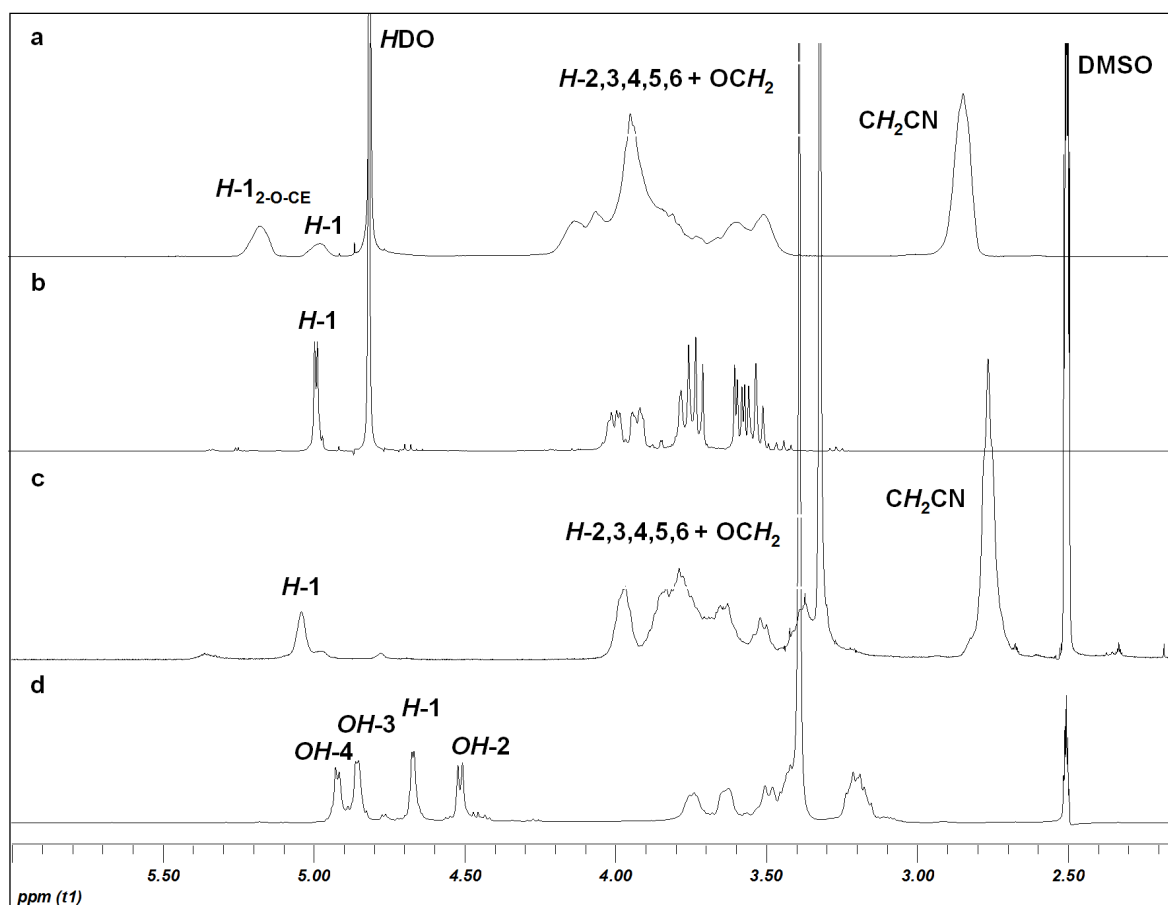


Abb. 4.6:  $^1H$ -NMR-Spektren ( $D_2O$ , 400 MHz) von (a) CED-9 ( $DS_{NMR} = 1,81$ ) in  $D_2O$ , (b) nativem Dextran in  $D_2O$ , (c) CED-6 ( $DS_{NMR} = 2,37$ ) in  $DMSO-d_6$ , (d) nativem Dextran (70 kDa) in  $DMSO-d_6$ .

Im Vergleich zum Ausgangsmaterial zeigen die Derivate starke Peakverbreiterungen und damit eine schlechtere Auflösung, wodurch die Auswertung der Spektren erheblich erschwert wird. Die Signale der eingeführten Cyanoethylgruppen sind deutlich bei 2,82 ppm in  $D_2O$  und entsprechend bei 2,75 ppm in  $DMSO-d_6$  für die Protonen der zur Cyanoethylgruppe benachbarten Ethylengruppe sichtbar. Das Protonsignal für  $H-1_{2-O-CE}$  liegt bei 5,18 ppm in  $D_2O$ . Dieses Proton ist im Fall einer Substitution in Position 2 gegenüber dem  $H-1$  Proton des Dextrans ( $\delta = 5,00$  ppm) tieffeldverschoben und kann aus diesem Grund leicht von diesem unterschieden werden. Die restlichen zwei Protonen des Cyanoethylsubstituenten überlappen mit den Protonen des Zuckerrings im Bereich von 3,3 - 4,2 ppm (in  $D_2O$ ). Der mittlere Substitutionsgrad wird aus dem Verhältnis des Integrals der zur Nitrilgruppe benachbarten Methylengruppe zu den summierten Integralen der  $H-1$  Protonen (Gleichung (4.1)) berechnet. Die Bestimmung der 2-O-Substitution kann bei in  $D_2O$  aufgenommenen  $^1H$ -NMR-Spektren von Cyanoethyl-

dextranen über das Signal des  $H-1_{2-O-CE}$  Protons im Vergleich zur Summe aller Integrale der  $H-1$  Signale erfolgen (Gleichung (4.2)).

$$DS_{CE} = \frac{\frac{1}{2} \int CH_2CN}{\int H1 + H1_{2-O-CE}} \quad (4.1)$$

$$DS_{2-O-CE} = \frac{\int H1_{2-O-CE}}{\int H1 + \int H1_{2-O-CE}} \quad (4.2)$$

Für cyanoethylierte Pullulane stellt sich die quantitative Auswertung von NMR-Spektren weitaus schwieriger dar, wie in Abb. 4.7 deutlich wird.

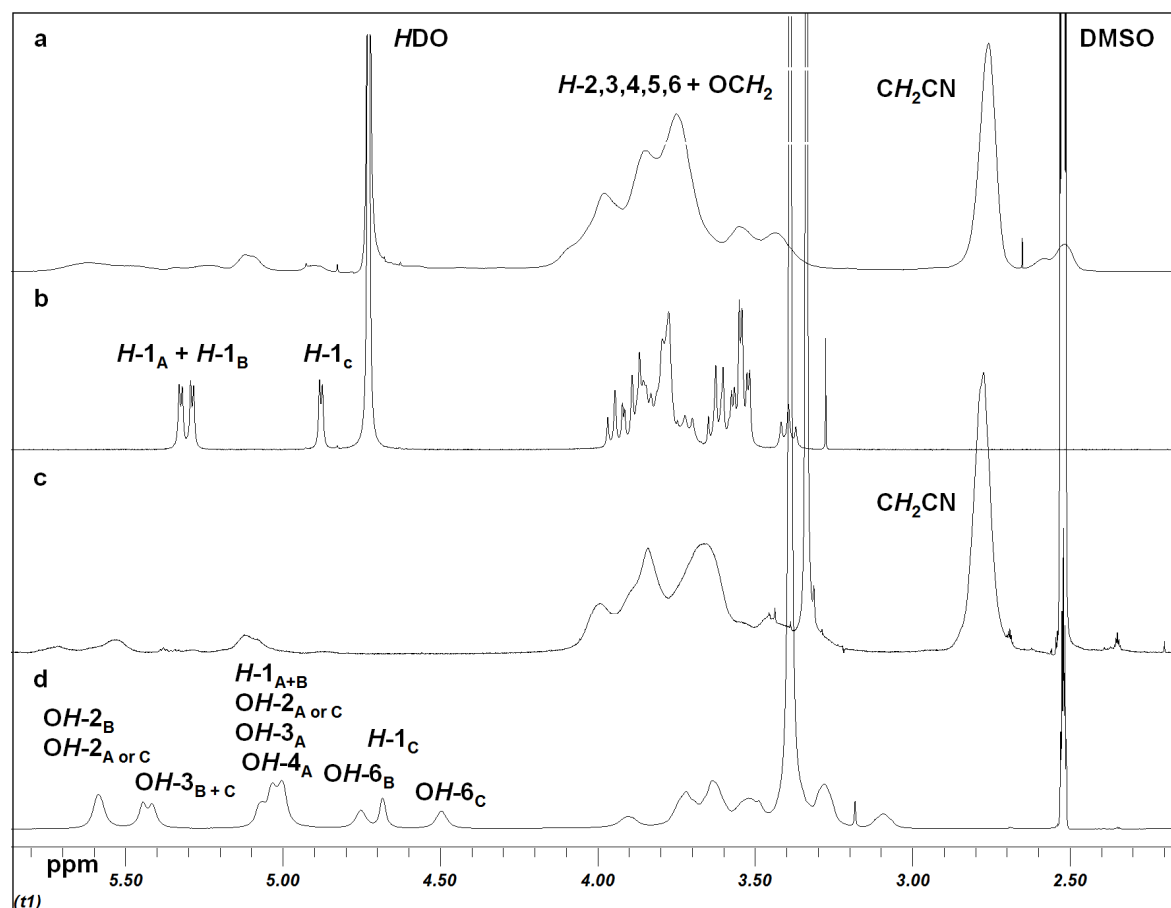


Abb. 4.7:  $^1H$ -NMR-Spektren (400 MHz) von (a) CEP-20 ( $DS_{NMR} = 1,31$ ) in  $D_2O$ , (b) nativem Pullulan in  $D_2O$ , (c) CEP-17 ( $DS_{NMR} = 2,43$ ) in  $DMSO-d_6$  und (d) nativem Pullulan  $DMSO-d_6$ , mit Ring A:  $\alpha$ -1,4-Glc, Ring B:  $\alpha$ -1,4-Glc und Ring C:  $\alpha$ -1,6-Glc.

Während das NMR-Spektrum von nativem Pullulan in  $D_2O$  (vergleiche Abb. 4.7 (d)) mit  $H-1$  Signalen bei 4,90 ppm ( $\alpha$ -1,6-Glc, Ring C vergleiche Abb. 1.1), 5,30 ( $\alpha$ -1,4-Glc, Ring A und  $\alpha$ -1,4-Glc, Ring B, vergleiche Abb. 1.1) gut aufgelöst ist, sind die Signale bei den entsprechenden Cyanoethylethern tieffeldverschoben, breit und schlecht aufgelöst. Dies ist eventuell auf einen zunehmend schlechteren Solvationszustand durch steigende

Hydrophobisierung mit steigender Substituentenzahl zurückzuführen und/oder auf erhöhte Viskosität infolge stärkerer Assoziation der Polymerketten. Die Region der anomeren Protonen ist daher sehr komplex und kaum integrierbar. Bei den in DMSO- $d_6$  gemessenen Proben verkompliziert sich dieser Sachverhalt, da die Protonen der Hydroxylgruppen zusätzlich in diesem Bereich detektiert werden. Eine DS-Berechnung kann erfolgen, indem das Integral der Methylengruppe bei 2,82 ppm ( $\text{CH}_2\text{-CN}$ ) und das der Zuckerringprotonen ins Verhältnis gesetzt werden. Das Integral der Ringprotonen muss um die zusätzlich enthaltenen zwei Protonen der Ethylengruppe korrigiert werden (vergleiche Gleichung (4.3)).

$$DS_{CE} = \frac{\frac{1}{2} \int CH_2CN}{\frac{1}{6} \left( \int H_{2,3,4,5,6_{a,b}} - \int CH_2CN \right)} \quad (4.3)$$

Die Signalintensitäten sowie die berechneten DS-Werte der einzelnen Cyanoethylglucane sind in Tabelle 4.2 dargestellt. Die Berechnung des partiellen DS-Wertes in Position 2, lässt die bevorzugte Substitution in dieser Position erkennen. Grund dafür ist die benachbarte Acetalfunktion, durch welche Elektronendichte abgezogen wird, wodurch die Deprotonierung in Position 2 am leichtesten erfolgen kann. Ein weiterer Effekt, der bei 1,4-Glucenen zur Erklärung der leichten Deprotonierung an dieser Stelle herangezogen wurde, ist die Stabilisierung des entstehenden Anions durch Koordination wie z.B. hier  $\text{Na}^+$  möglich. Dadurch ist auch die 2-Reaktivität von  $\alpha$ - im Vergleich zu  $\beta$ -Glucanen gesteigert (vergleiche Abb. 4.8).<sup>[48]</sup>

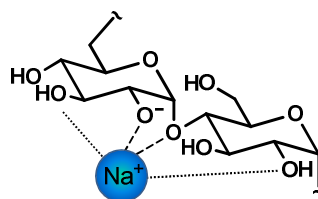


Abb. 4.8: Wahrscheinliche Stabilisierung des Glucosylanions an O-2 durch Koordination mit  $\text{Na}^+$  in einem  $\alpha$ -Glucan. Abbildung nach Mischnick.<sup>[48]</sup>

Tabelle 4.2: Ergebnisse der quantitativen Auswertung der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der Cyanoethylglucane.

Ansatz	Lösungsmittel (deutert)	DS (4.1) <sup>a</sup>	DS <sub>2-O-CE</sub> (4.2) <sup>a</sup>	Subs. in Position 2 [%]	DS (4.3) <sup>a</sup>
CED-1	D <sub>2</sub> O	1,77	0,71	40	1,65
CED-2	D <sub>2</sub> O	1,77	0,70	40	1,62
CED-3	D <sub>2</sub> O	1,68	0,67	40	1,50
CED-4	D <sub>2</sub> O	1,86	0,72	39	1,64
CED-5	D <sub>2</sub> O	1,01	0,47	46	0,97
CED-6	DMSO	2,37	0,09	4	2,51
CED-7	D <sub>2</sub> O	0,29	0,12	42	0,24
CED-8	D <sub>2</sub> O	0,61	0,08	14	0,38
CED-9	D <sub>2</sub> O	1,81	0,72	40	1,61
CED-10	DMSO	2,72	0,12	7	2,86
CED-11	D <sub>2</sub> O	1,78	0,64	36	1,65
CED-12	D <sub>2</sub> O	1,60	0,52	32	1,50
CED-19	D <sub>2</sub> O	1,40	0,63	45	1,32
CED-20	DMSO	1,90	0,73	39	1,73
CED-21	D <sub>2</sub> O	2,20	0,11	5	2,32
CEP-9	D <sub>2</sub> O				0,73
CEP-11	D <sub>2</sub> O				0,70
CEP-12	D <sub>2</sub> O				0,73
CEP-13	D <sub>2</sub> O				0,69
CEP-14	D <sub>2</sub> O				0,70
CEP-15	D <sub>2</sub> O				0,58
CEP-16	D <sub>2</sub> O				0,65
CEP-17	DMSO				2,43
CEP-19	D <sub>2</sub> O				0,89
CEP-20	D <sub>2</sub> O				1,31

<sup>a</sup> Eingeklammert: Nummer der zur Berechnung herangezogenen Gleichung.

### Elementaranalyse:

Aus den mittels Elementaranalyse (EA) bestimmten Gehalten (Gew.%) an Kohlenstoff, Wasserstoff und Stickstoff kann der DS-Wert für Cyanoethylglucane über den Stickstoffgehalt berechnet werden (Gleichung 4.4).

$$DS = \frac{(162,15 * N)}{(1401 - (54,08 * N))} \quad (4.4)$$

162,15: molare Masse AGU

1401: molare Masse Stickstoff x 100

54,08: molare Masse Cyanoethylsubstituent

N: Stickstoffgehalt

Um Fehlinterpretationen aufgrund von Verunreinigungen zu vermeiden, wurde zusätzlich der DS-Wert aus dem C/N-Verhältnis berechnet und zum Vergleich herangezogen. In der



folgenden Tabelle 4.3 sind die experimentell ermittelten Daten aus den Elementaranalysen dargestellt.

*Tabelle 4.3: DS-Werte von Cyanoethylglucanen (Tabelle 4.1) über Elementaranalysen (a) Berechnung über Stickstoffgehalt (Gleichung 4.4), (b) Berechnung über C/N Verhältnis.*

<b>Ansatz</b>	<b>DS über N-Gehalt aus EA</b>	<b>DS über C/N</b>
<b>CED-1</b>	1,73	1,81
<b>CED-2</b>	1,67	1,74
<b>CED-3</b>	1,52	1,59
<b>CED-4</b>	1,74	1,82
<b>CED-5</b>	0,86	0,91
<b>CED-6</b>	2,68	2,72
<b>CED-8</b>	0,42	0,48
<b>CED-9</b>	1,47	1,55
<b>CEP-11</b>	0,63	0,70
<b>CEP-12</b>	0,64	0,67
<b>CEP-13</b>	0,66	0,70
<b>CEP-14</b>	0,66	0,70
<b>CEP-15</b>	0,50	0,54
<b>CEP-16</b>	0,60	0,65
<b>CEP-17</b>	2,36	2,20
<b>CEP-19</b>	0,90	0,97
<b>CEP-20</b>	1,36	1,42

Es zeigte sich, dass die Berechnung über den Stickstoffgehalt und das C/N-Verhältnis nur geringfügig voneinander abweichen. Die Cyanoethylglucane sind somit relativ rein. Die Elementaranalyse ist somit eine schnelle und zuverlässige Methode um den Cyanoethylierungsgrad abzuschätzen.

### **Bestimmung der Monomersubstitution mittels Gaschromatographie**

Um detailliertere Informationen über die Verteilung der Substituenten in den Glucosyl-einheiten zu erlangen, wurden die Cyanoethylglucane hydrolysiert und trimethylsilyliert. Die entstandenen Trimethylsilyl *O*-cyanoethyl-*O*-trimethylsilyl- $\alpha,\beta$ -D-glucoside wurden mittels GLC-FID analysiert. Wie aus früheren Arbeiten bekannt ist, treten bei der Methanolyse vielen Nebenprodukten auf, da unter diesen Bedingungen die Cyano-gruppen leichter zu Methylestern umgesetzt werden.<sup>[129]</sup> Zudem werden die Methyl-glucosidderivate viel schlechter getrennt. Die Darstellung von Alditolacetaten war nicht erfolgreich. Die Cyanogruppen sind unter den Reduktionsbedingungen nicht stabil und es ergeben sich komplexe Gemische. Für die Analytik mittels GC bzw. GC-MS wurde die in Abb. 4.9 aufgeführte Reaktionsreihenfolge von Hydrolyse und Trimethylsilylierung auf alle

Cyanoethylpolysaccharide angewandt. Die Peakflächen der GLC-FID Messungen wurden entsprechend dem "Effective Carbon Response Concept" korrigiert.<sup>[71,127]</sup> Die Bildung von *O*-Carboxyethylderivaten durch Hydrolyse der Cyanogruppe konnte nicht vollständig unterbunden werden. Diese Nebenprodukte beeinflussen jedoch nicht die relative Substituentenverteilung, sondern bewirken nur eine Diskriminierung des berechneten DS-Wertes um bis zu 12 %, wie durch Berücksichtigung aller Nebenprodukte ermittelt wurde. Im Folgenden werden nur die DS-Werte ohne Berücksichtigung der Hydrolyseprodukte verwendet.

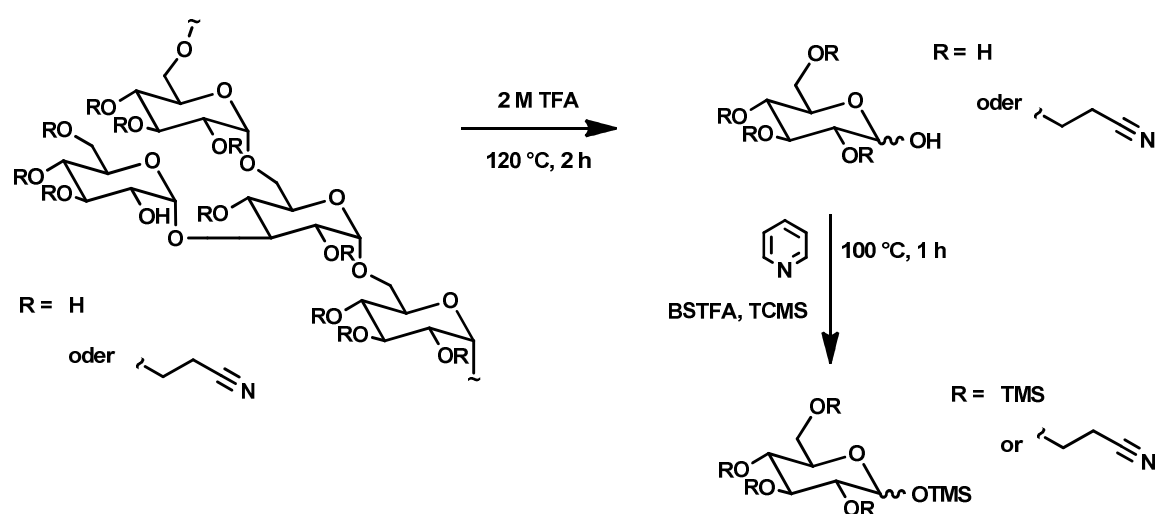


Abb. 4.9: Reaktionsschritte der Depolymerisation von Cyanoethylglucanen: Hydrolyse (2 M TFA, 120 °C, 2 h).

Die Charakterisierung der silylierten Verbindungen erfolgte mittels GC-MS. Sind Cyanoethylgruppen im Produkt vorhanden, so ergeben sich für jede Position der Substitution spezifische *m/z*, die in Tabelle 4.4 aufgeführt sind.<sup>[127]</sup>

Tabelle 4.4: Diagnostische *m/z*-Werte von TMS-*O*-CE/*O*-TMS-Glucosiden aus EI-Massenspektren.<sup>[127]</sup>

Fragmentation (enthaltene C)	SiMe <sub>3</sub> tetra- <i>O</i> -SiMe <sub>3</sub> -Glc [ <i>m/z</i> ]	Detektiertes Fragmentation [ <i>m/z</i> ] bei CE-Substitution in Position			
		O-2	O-3	O-4	O-6
C-2 - C-3 (C-3 - C-4)	204	185	185	185 < 204	204
C-2 - C-3 - C-4	217	198 < 217	217	198	217
R <sup>1</sup> O - C-1 - OR <sup>3</sup>	191	191	172	191	191

Abb. 4.10 zeigt, die auf Tabelle 4.4 basierende Zuordnung der Peaks zu den Cyanoethyl-Substitutionsmustern.

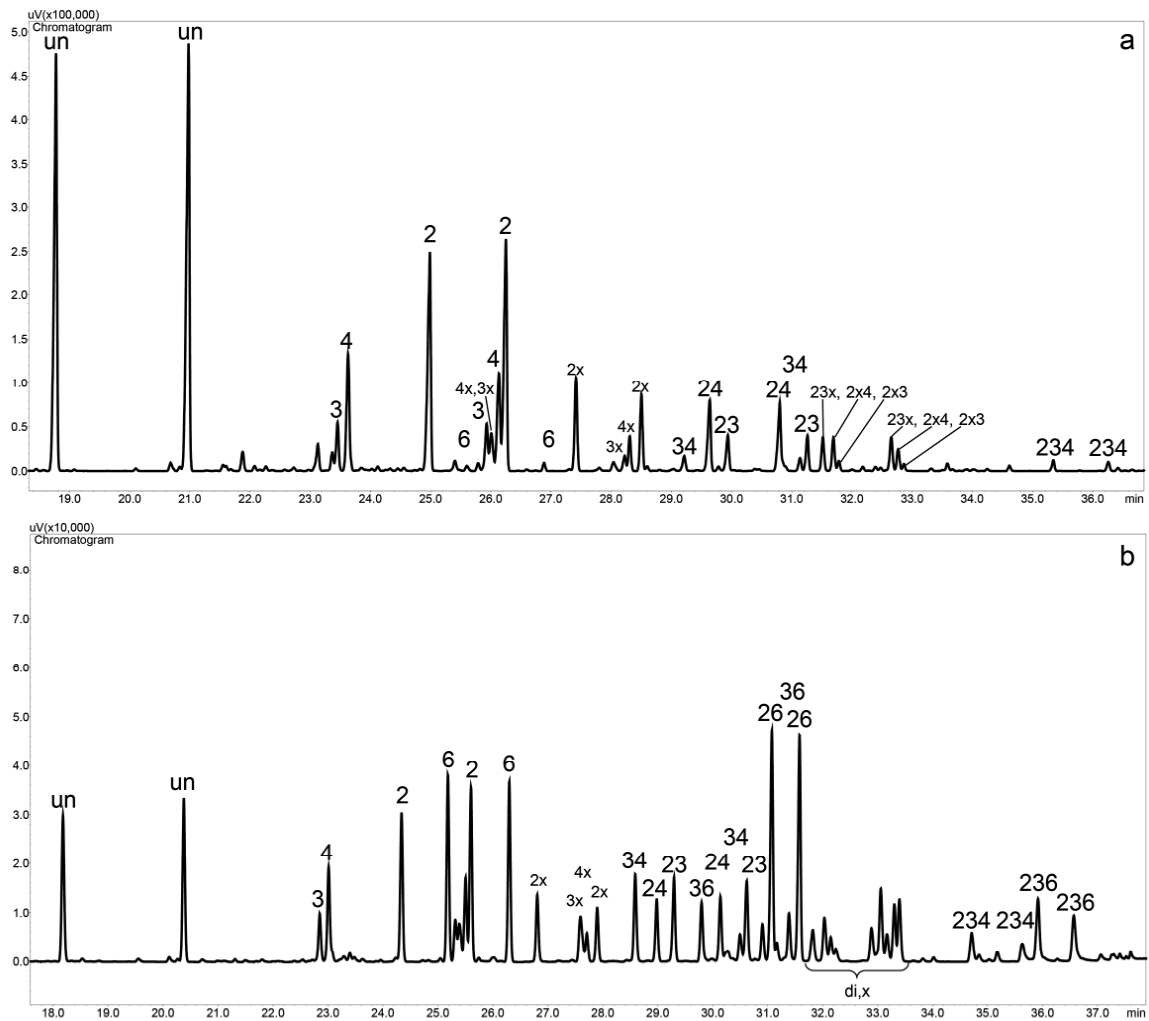


Abb. 4.10: Gaschromatogramm der hydrolysierten und trimethylsilylierten Cyanoethylglucane, (a) CED-5 ( $DS_{GC} = 0,74$ ), (b) CEP-20 ( $DS_{GC} = 1,52$ ),  $x$  = Nebenprodukte infolge der Hydrolyse der Nitrilgruppe (O-Carboxyethyl-TMS-Ester),  $di,x$  =  $3x,6CE$ , 2 oder  $4x,CE$ ,  $2x,6CE$ ,  $3x,6CE$ , 2 oder  $4x,CE$ ,  $2x,6CE$ , un: unsubstituierte Glucose.

Die relative molare Zusammensetzung der verschiedenen Glucosebausteine wurde mit der berechneten statistischen Verteilung verglichen. Dabei wurden die experimentell gefundenen unterschiedlichen Reaktivitäten der Hydroxylgruppen berücksichtigt. Die 6-O-Substitution der terminalen Glucosyleinheiten wurde vernachlässigt, indem diese zu den entsprechenden substituierten Bausteinen ohne 6-O-CE addiert wurden (also 2,6 zu 2 usw.). So waren für die Cyanoethyl-dextrane acht verschiedene Bausteine zu berücksichtigen: unsubstituiert ( $s_0$ ), in Position 2, 3 oder 4 monosubstituierte ( $s_2$ ,  $s_3$ ,  $s_4$ ), in den Positionen 2,3, 2,4, oder 3,4 disubstituierte ( $s_{23}$ ,  $s_{24}$ ,  $s_{34}$ ) und 2,3,4-tri-O-substituierte Glucosyleinheiten ( $s_{234}$ ) (vergleiche Kapitel 1.3).

Im Fall des Pullulans, mussten zusätzlich die Muster 6-, 2,6-, 3,6- und 2,3,6-CE einbezogen werden. Das tetra-O-substituierte Monomer ( $s_{2346}$ ), als ein mögliches Produkt der Endgruppen wurde weder in Dextranen noch in Pullulanen nachgewiesen. Die Substitutionen in Position 4 oder 6 wurden entsprechend ihrer Verfügbarkeit im Pullulanmolekül (bestehend aus  $\alpha$ -1,6 Maltotrioseeinheiten) von 1 : 2 gewichtet (vgl. Kapitel 3).

Die Ergebnisse der Monomeranalytik sind in Tabelle 4.5 für repräsentative Cyanoethylglucane mit niedrigem, mittlerem und hohem DS-Wert zusammengefasst. Eine Zusammenstellung der Monomerzusammensetzung von allen Cyanoethylglucanen ist in Abschnitt 11.3 zu finden.

Tabelle 4.5: Monomerzusammensetzung [Mol-%] ( $s_n$ ), von un-, mono-, di- und trisubstituierten Glucoseeinheiten ( $c_n$ ) ( $DS_{GC}$  berechnet ohne O-Carboxyester Derivate) und partielle DS-Werte ( $x_n$ ) in Position 2, 3, 4, 6;  $H_1$ : Heterogenitätsparameter.

Ansätze		CED-5	CED-9	CED-6	CEP-19	CEP-20	CEP-17
<b>Monomer</b>	$s_0$	43,20	14,97	2,29	37,90	11,32	0,49
<b>Zusammensetzung</b>	$s_2$	24,61	21,76	2,92	25,39	11,82	1,05
<b>[Mol-%]</b>	$s_3$	4,85	5,39	2,65	4,28	3,52	0,88
	$s_4$	11,86	12,19	3,38	3,65	6,86	1,26
	$s_6$				9,02	13,98	6,63
	$s_{23}$	4,02	11,41	13,58	2,94	7,03	3,69
	$s_{24}$	8,46	21,36	6,80	2,97	5,23	1,12
	$s_{26}$				6,28	19,66	15,07
	$s_{34}$	1,80	4,46	15,39	4,20	5,26	6,54
	$s_{36}$				1,62	4,81	10,14
	$s_{234}$	1,20	8,46	52,99	0,33	3,34	16,53
	$s_{236}$				1,41	7,17	36,60
<b>Anteile der un-, mono-, di</b>	$c_0$	43,20	14,97	2,29	37,90	11,32	0,49
<b>di-, trisubstituierten Glc</b>	$c_1$	41,31	39,34	8,95	42,35	36,17	9,82
	$c_2$	14,28	37,23	35,78	18,01	41,99	36,55
	$c_3$	1,20	8,46	52,99	1,74	10,51	53,14
<b>Partielle DS-Werte</b>	$x_2$	0,38	0,63	0,76	0,39	0,54	0,74
	%	52,1	45,3	31,9	47,1	35,8	30,6
	$x_3$	0,12	0,30	0,85	0,15	0,31	0,74
	%	16,2	21,4	35,3	17,7	20,5	30,7
	$x_4$	0,23	0,46	0,79	0,11	0,21	0,25
	%	31,7	33,4	32,8	13,4	13,6	10,5
	$x_6$				0,18	0,46	0,68
	%				21,9	30,1	28,2
	<b>DS</b>	<b>0,74</b>	<b>1,39</b>	<b>2,40</b>	<b>0,84</b>	<b>1,52</b>	<b>2,42</b>
	$H_1^a$	0,30	0,39	0,51	0,43	0,43	0,55

<sup>a</sup>  $H_1 = \sqrt{\sum_{i=0}^{234} \Delta = s_i^2 / n}$ ,  $\Delta = s_i(\text{theor.}) - s_i$  mit  $s_i$  = Molfraktion der Glucoseeinheiten, substituiert in Position i,  $n = 8$  für Dextran,  $n = 12$  für Pullulan.

Die Proben CED-5 und CEP-19, die ohne Aceton als Co-Solvent hergestellt wurden, weisen die geringsten DS-Werte auf. Durch Addition von 1 mL Aceton bei sonst gleichbleibenden Reaktionsbedingungen (vergleiche Tabelle 4.1) konnten die DS-Werte um fast 100 % gesteigert werden (CED-9 und CEP-20). Die höchsten Substitutionsgrade wurden mit den Reaktionsbedingungen nach Onda<sup>[65]</sup> erreicht (CED-6 und CEP-17). In

diesen Ansätzen wurden Aceton und Acrylnitril im gleichen Gewichts-Verhältnis eingesetzt. Reaktionszeit und Basenkonzentration wurden erhöht (2 eq NaOH/Glc). Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Es kann angenommen werden, dass Aceton als eine Art Lösungsintermediator wirkt und wahrscheinlich den Kontakt von Acrylnitril und Glucan verbessert. Zudem kann das mit fortschreitender Reaktion immer hydrophober werdende Polymer durch den Einfluss von Aceton besser in Lösung gehalten werden.

Die Ergebnisse der GLC-Analytik ergaben, dass die thermodynamisch kontrollierte Regioselektivität für alle Cyanoethyl-dextrane der Reihenfolge O-2 > O-4 > O-3 folgt. Die Ordnung der partiellen DS-Werte für cyanoethylierte Pullulane verschiebt sich mit steigender Substitution zugunsten von Position 6.

Wird der relativen Anteile der Hydroxylgruppen im Pullulanmolekül berücksichtigt, ergibt sich ein Verhältnis von 3 : 3 : 1 : 2 für O-2, O-3, O-4 und O-6. Bei Cyanoethylpullulanen mit mittleren DS-Wert (CEP-20,  $DS_{GC} = 1,52$ ) wird die Abfolge O-6 > O-4 > O-2 > O-3 beobachtet. Bei hochsubstituierten Pullulanen wie CEP-17 ( $DS_{GC} = 2,42$ ), wird die bevorzugte Umsetzung an den sekundären Hydroxylgruppen in Position 2 durch den steigenden DS-Wert nivelliert. Bei einem geringen Substitutionsgrad (CEP-19,  $DS_{GC} = 0,84$ ) ist die Reaktion in der Position 2 mit der höchsten Acidität favorisiert. Werden Pullulane mit Dextranen hinsichtlich ihrer Präferenz der 2-O-Cyanoethylierung verglichen, so ist diese in Pullulanen weniger ausgeprägt. Aus früheren Arbeiten ist eine größere Präferenz der 6-O-Substitution (50 %) vor der 2-O-Substitution (37 %) für ausschließlich  $\alpha$ -1,4-verknüpfte Amylosen bekannt. Die Umsetzung dort wurde in wässrigen Pasten durchgeführt.<sup>[128]</sup>

Im Rahmen einer Diplomarbeit konnte gezeigt werden, dass Nitrilgruppen auch durch die Substitution von Alkylnitrilen (z.B. 4-Brombutyronitril) über den Mechanismus der Williamson-Ethersynthese in Glucane eingeführt werden können. Auf diese Weise kann der Abstand von Nitrilgruppen und Polysaccharidrückgrat durch Einsatz von Reagenzien mit längeren Alkylresten variieren. Die Reihenfolge der Substitution wurde mit  $2 > 4 \geq 3$  bestimmt und spiegelt damit die Ergebnisse der Alkylierung aus Kapitel 3 wider.<sup>[130]</sup> Die Substituentenverteilung ist hier kinetisch und nicht thermodynamisch kontrolliert wie bei der Michael-Addition.

Für die Cyanoethylierungen mit Acrylnitril als Akzeptor zeigt der Heterogenitätsparameter  $H_i$  die durchschnittliche Abweichung der experimentellen Daten von einer zufälligen Verteilung, wobei die partiellen DS-Werte ( $x_i$ ) der einzelnen OH-Gruppen bei der Berechnung berücksichtigt werden. Eine DS-Wert-Abhängigkeit von  $H_i$  ist infolge der DS-Begrenzung auf O-3 inhärent. Die höchste Heterogenität kann bei mittleren DS-Werten um 1,5 auftreten. Bei einer Annäherung an die Grenzen (DS = 0 und 3), geht die mögliche Abweichung der Substituentenverteilung gegen Null. Die für Cyanoethylglucane kalkulierten Heterogenitätswerte (vergleiche Abschnitt 11.3) sind niedrig und

damit charakteristisch für eine thermodynamisch kontrollierte Reaktion.<sup>[49]</sup> Minimale Abweichungen vom statistischen Modell liegen im Rahmen der Messungenauigkeit der Methode. Die entsprechenden Graphen der Substituentenverteilung in den Glucosyleinheiten von Cyanoethylglucanen sind in den Abbildungen 4.11 und 4.12 dargestellt.

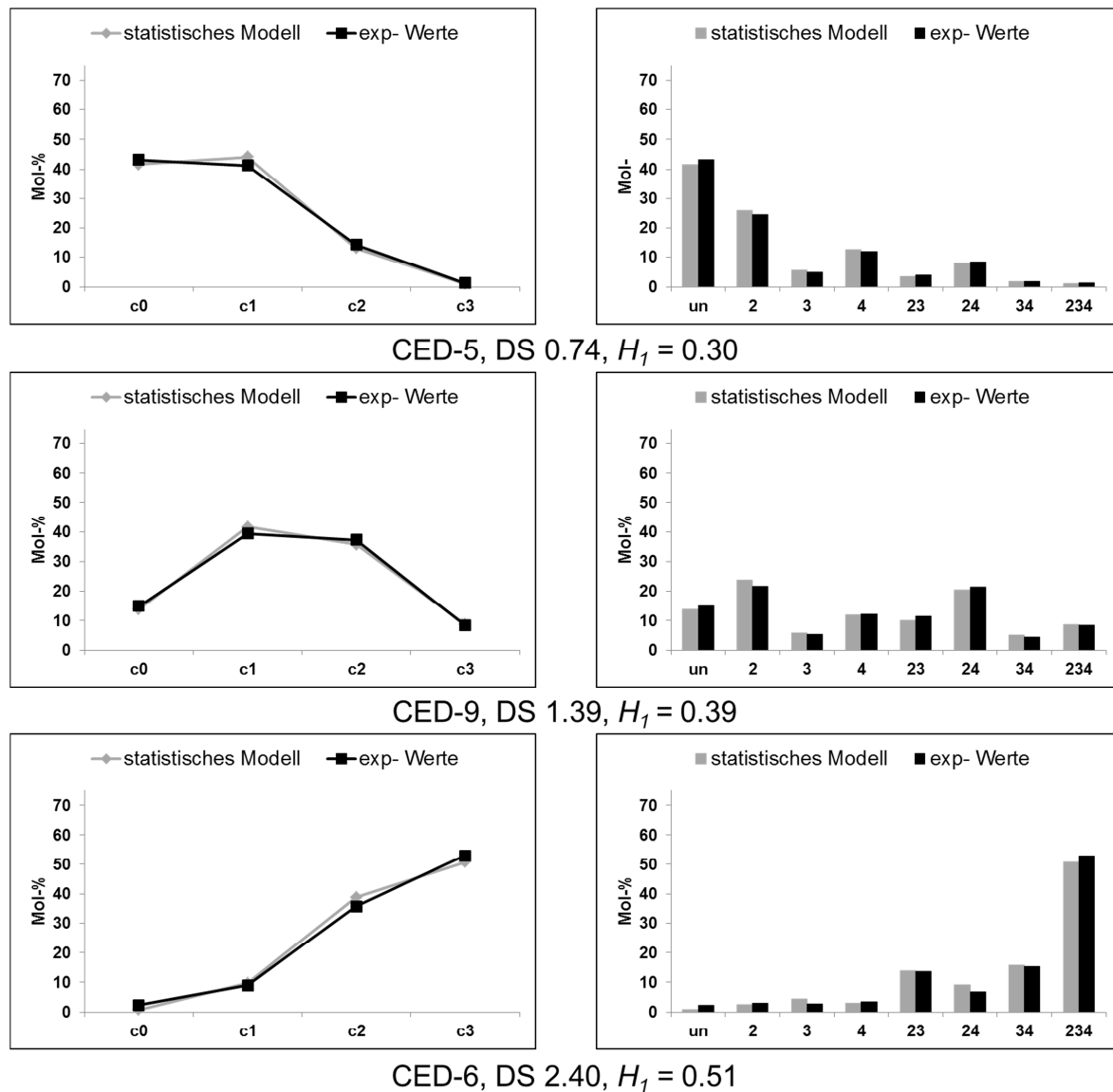


Abb. 4.11: Vergleich der Substituentenverteilung in den Glucosyleinheiten der Cyanoethylglucane CEP-5, 9 und 6 mit einer zufälligen Verteilung, die unter Berücksichtigung der partiellen DS-Werte der einzelnen OH-Gruppen berechnet wurde.

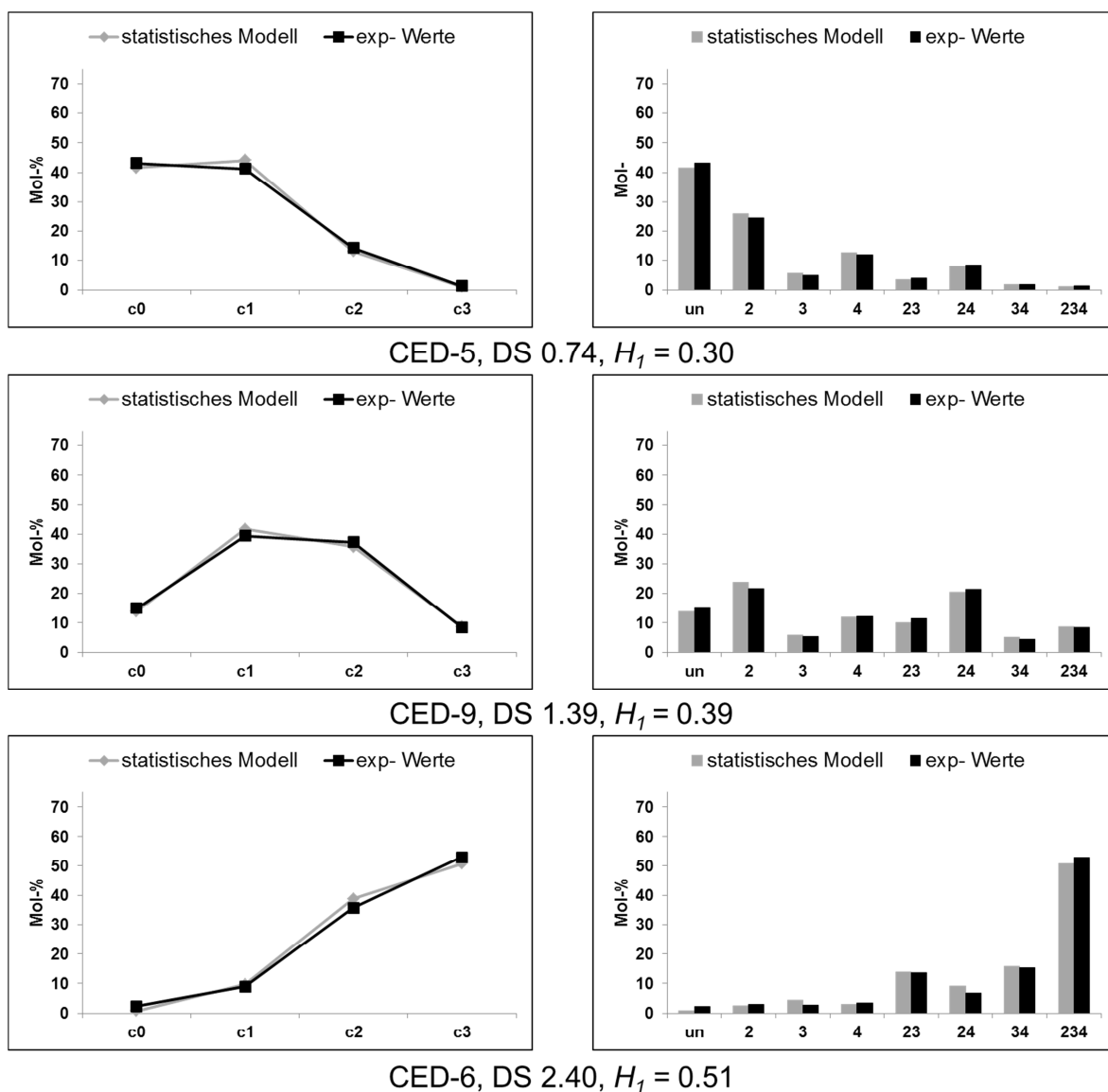


Abb. 4.12: Vergleich der Substituentenverteilung in den Glucosyleinheiten der Cyanoethylpullulane CEP-17, 19 und 20 -3 mit einer zufälligen Verteilung die unter Berücksichtigung der partiellen DS-Werte der einzelnen OH-Gruppen berechnet wurde.

Im Folgenden werden die einzelnen Reaktionsbedingungen der Cyanoethylierung von Glucanen diskutiert (Tabelle 4.1). Bei den mit 0,2 eq NaOH in Wasser hergestellten Cyanoethyl-dextranen erbrachte die Steigerung des Acrylnitrilanteils von 4 auf 10 eq/Glucoseeinheit in der Probenreihe CED-1 bis CED-4 (Acrylnitril mit 1 eq/AGU konstant) keine Erhöhung des DS-Wertes. Der durchschnittliche DS-Wert lag bei 0,39. Auch mit Erhöhung der NaOH-Menge von 0,4 bis 1 eq/AGU bei den Proben CEP-11 bis CEP-14 konnte die Cyanoethylierung nicht gesteigert werden. Die  $DS_{GC}$ -Werte lagen im Bereich von ( $DS_{GC} = 0,51$  bis  $0,56$ ). Ein Vergleich der DS-Werte von CED-6 ( $DS_{GC} = 2,40$ ) mit CED-10 ( $DS_{GC} = 2,17$ ) und CED-21 ( $DS_{GC} = 2,27$ ) zeigt, dass die Cyanoethylierung nach Onda<sup>[65]</sup> reproduzierbar ist. Bei diesen Ansätzen nach der Patentmethode ist eine Abweichung der Substituentenverteilung zu erkennen. Während

sich für die monosubstituierten Baustein die Reihenfolge  $3 > 4 > 2$  ergibt ist bei den disubstituierten Glucosyleinheiten die Folge  $3,4 > 2,3 > 2,4$  (vergleiche Abb. 4.11 und Abschnitt 11.3). Dieser Effekt könnte durch den erhöhten Acetonanteil in diesem Versuch erklärt werden. Werden die Synthesen mit 300 mg Polysaccharid in 1 mL Wasser und 4 eq Acrylnitril sowie 0,2 eq Base miteinander verglichen, so sind auch diese Versuchsansätze (CED-1, CED-11 und CED-12) mit DS-Werten im Bereich von 1,33 bis 1,43 als reproduzierbar anzusehen. Abweichungen könnten durch unterschiedliche Durchmischung des Reaktionsmediums oder schwankende Raumtemperaturen begründet sein. Bei einer Vervierfachung der Reagenzmengen bei den Proben CED-5, 8, 9 und 19 liegen die resultierenden DS-Werte mit 0,74, 0,34, 1,39 und 1,04 sehr stark auseinander. Diese Abweichung ist hier in der unterschiedlichen Durchmischung (je nach verwendetem Equipment) zu erklären. Die Reaktionsmatrix bei diesen Ansätzen war sehr viskos. Die DS-Werte, die mittels verschiedener Methoden bestimmt wurden, sind vergleichend in Tabelle 4.6 aufgelistet und in Abb. 4.13 graphisch dargestellt.

*Tabelle 4.6: Übersicht der DS-Bestimmung Cyanoethylglucane (Reaktionsbedingungen in Tabelle 4.1) mit unterschiedlichen Methoden.*

<b>Ansatz</b>	<b>DS<sub>NMR</sub></b>	<b>DS<sub>EA</sub></b>	<b>DS<sub>GC</sub></b>	<b>Ausbeute [%]<sup>a</sup></b>
<b>CED-1</b>	1,77	1,73	1,41	88
<b>CED-2</b>	1,77	1,67	1,41	87
<b>CED-3</b>	1,68	1,52	1,25	90
<b>CED-4</b>	1,86	1,74	1,45	95
<b>CED-5</b>	1,01	0,86	0,74	83
<b>CED-6</b>	2,37	2,68	2,40	86
<b>CED-7</b>	0,29	-	-	-
<b>CED-8</b>	0,61	0,42	0,34	85
<b>CED-9</b>	1,81	1,47	1,39	72
<b>CED-10</b>	1,72	-	2,17	64
<b>CED-11</b>	1,78	-	1,43	52
<b>CED-12</b>	1,60	-	1,33	60
<b>CED-19</b>	1,40	-	1,04	84
<b>CED-20</b>	1,90	-	1,28	62
<b>CED-21</b>	2,20	-	2,27	81
<b>CEP-9</b>	0,73	-	0,50	97
<b>CEP-11</b>	0,70	0,63	0,51	96
<b>CEP-12</b>	0,73	0,64	0,56	90
<b>CEP-13</b>	0,69	0,66	0,56	96
<b>CEP-14</b>	0,70	0,66	0,54	96
<b>CEP-15</b>	0,58	0,50	0,42	92
<b>CEP-16</b>	0,65	0,60	0,49	93
<b>CEP-17</b>	2,43	2,36	2,42	79
<b>CEP-19</b>	0,89	1,56	0,84	76
<b>CEP-20</b>	1,31	-	1,52	72

<sup>a</sup> Ausbeute der Produkte, berechnet auf Basis DS<sub>GC</sub>.

Mit allen verwendeten Methoden wurden ähnliche DS-Werte bestimmt. Die Elementaranalyse ist eine schnelle Methode um das Polymermaterial zu untersuchen. Hierbei müssen die relativen Verhältnisse von C, H und N ebenfalls betrachtet werden, da der



Stickstoffgehalt durch Verunreinigungen, durch Nebenprodukte oder verbliebene Edukte beeinflusst sein kann. Die aus den Gaschromatogrammen der Hydrolyseprodukte „zusammengesetzten“ DS-Werte zeigen eine gute Übereinstimmung mit den Elementaranalysen. Werden die bei der GC-Derivatisierung entstehenden Nebenprodukte nicht zur Berechnung des Substitutionsgrades herangezogen, so ist dieser erniedrigt. Die NMR-Spektroskopie ist eine Methode bei der das intakte Polymer eingesetzt und wiedergewonnen werden kann. Da es bei den untersuchten Polysaccharidderivaten zu Peakverbreiterung kommt ist die quantitative Auswertung ungenau. Das schnellere Relaxieren der beweglicheren Protonen der Substituenten gegenüber der Glucankette führt zu deren Überbewertung und zu leicht erhöhten DS-Werten (Abb. 4.13). Wird DMSO- $d_6$  als Lösungsmittel für die NMR-Experimente verwendet, sind im Bereich der anomeren Protonen zudem die Signale der Hydroxylgruppen sichtbar. Um trotz dieser Schwierigkeiten zufriedenstellende Ergebnisse zu erhalten, wurden verschiedene Berechnungsansätze (Gleichung (4.1) und (4.3)) entwickelt. Bei den durchgeführten Cyanoethylierungen (Tabelle 4.1) wurden gute Ausbeuten (zumeist 80 - 90 %) erhalten. Die Bildung von Nebenprodukten, wie Amiden oder Carboxylaten, wurde mittels IR- und NMR-Messungen ( $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$ ) überprüft. Lediglich in den IR-Spektren waren bei einigen Proben Spuren im Bereich der Amidbande erkennbar. Eine Homopolymerisation des Acrylnitrils, wie Chatterjee und Conrad<sup>[131]</sup> sie beschreiben, konnte durch den Vergleich der DS-Werte aus Elementaranalysen (N und C/N Verhältnis) mit denen aus den gaschromatographischen Messungen ausgeschlossen werden.

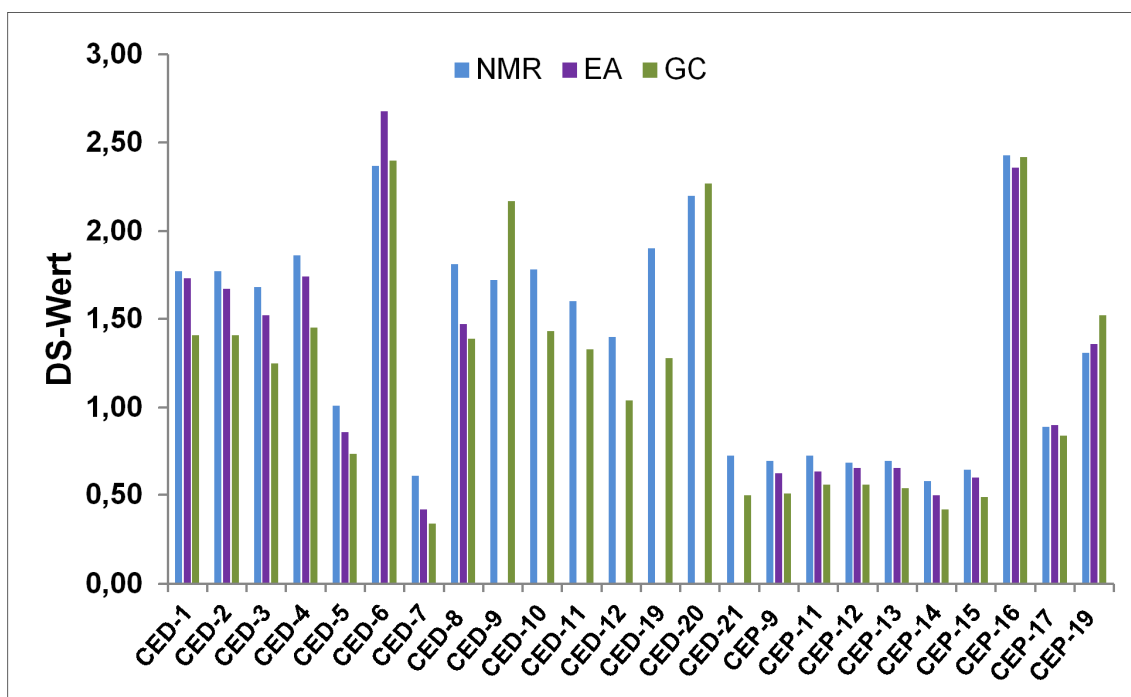


Abb. 4.13: Übersicht der mit verschiedenen Methoden bestimmten DS-Werte für Cyanoethylglucane, Zahlenwerte in Tabelle 4.2 bis 4.3 und Abschnitt 11.3.

Ein interessanter Effekt wurde beobachtet, wenn bei der Cyanoethylierung von Pullulan zum Reaktionsende die zur Neutralisation ausreichende Säuremenge überschritten wurde und das Reaktionsgemisch somit angesäuert vorlag. In diesem Fall wies die Produktmatrix eine zähe Konsistenz auf und ließ sich nur sehr schwer und nicht quantitativ aus dem Reaktionsgefäß in den Dialyseschlauch überführen. Nach Gefrier-trocknung lagen z.T. sehr harte plastikartige Rückstände neben Produktbestandteile mit weicher Konsistenz vor. (Abb. 4.14). Diese watteartige Beschaffenheit ist typisch für alle in dieser Arbeit vorgestellten Cyanoethylglucane. Die harten Produkte bildeten in Wasser nach längerem Rühren eine „schmierige“ Bodenschicht aus, die nach der Entfernung des Lösungsmittels wieder hart wurde. In Aceton und Acetonitril ist dieser Effekt ebenfalls zu beobachten.



*Abb. 4.14: Links: typische watteartige Beschaffenheit von Cyanoethylglucanen nach Dialyse und Gefrier-trocknung, rechts: harte Bestandteile bei der Cyanoethylierung von Pullulan (100 kDa) nach Ansäuern des Reaktionsgemisches zum Reaktionsende und anschließender Dialyse.*

Der Vergleich von IR-,  $^1\text{H}$ -NMR-, GC- sowie EA-Analysen zeigten keine Unterschiede zwischen den weichen und harten Produktbestandteilen. Um zu überprüfen, wie es zur Entstehung dieser harten Bestandteile kam, wurde ein Blindversuch ohne Pullulan durchgeführt. Es entstanden keine harten Rückstände. Die Säurezugabe bewirkt folglich nur in Gegenwart von Pullulan die Verhärtungen. Es kann angenommen werden, dass es durch das Ansäuern zu einer Art Vernetzung gekommen ist. Eine Homopolymerisation von Acrylnitril kann ausgeschlossen werden.<sup>[131]</sup> Bei Tests mit Dextranen entstanden keine harten Produktbestandteile.

Die weitere Verwendung der Cyanoethylderivate als Vorstufe für Aminoalkylglucane wird im nächsten Kapitel diskutiert. Ihre Eignung zur Bildung von Nanopartikeln wird in Kapitel 7 vorgestellt.

## 5 Aminopropylglucane

Im folgenden Kapitel werden verschiedene Methoden zur Aminofunktionalisierung von Polysacchariden mit ihren Vor- und Nachteilen diskutiert. Für diese Arbeit wurde die Reaktionsfolge Cyanoethylierung mit anschließender Reduktion zur Einführung von Aminogruppen gewählt. Die Aminogruppen sollen später als Verknüpfungsstellen für Biomarker dienen.

### 5.1 Aminofunktionalisierung von Glucanen

Die Einführung von Aminofunktionen in Polysaccharide wurde von Piehler et al. durch Periodatoxidation mit anschließender reduktiver Aminierung realisiert.<sup>[132]</sup> Im ersten Schritt dieser Reaktion werden über Diolsplaltung Aldehydgruppen erzeugt, welche dann mit einer Aminokomponente eine Schiffsche Base bilden und durch ein geeignetes Reduktionsmittel (z.B.  $\text{NaCNBH}_3$ ) reduziert werden. Diese Art der Aminierung erfolgt jedoch unter partieller Zerstörung des Polysaccharidrückgrates und die Aminogruppen sind direkt am Polymer gebunden. Der Verlust der Acetalfunktion erhöht zudem die Säureempfindlichkeit der Polysaccharide. Durch die Nachbarschaft der Carbonylgruppen im geöffneten Zuckerring können Aminierungsreaktionen zur Bildung von cyclischen sekundären Aminen führen.<sup>[133]</sup> Piehler et al. konnten diese Modifizierung u.a. für Dextrane anwenden und Glasoberflächen beschichten, sodass diese als direkte Immunsonden dienen können.<sup>[132]</sup>

In dieser Arbeit war es Ziel, das Grundgerüst der Glucane und damit die intrinsischen Eigenschaften der Polymere zu erhalten. Zudem sollten die Aminogruppen über variable Spacer am Zuckergerüst gebunden sein. Aus diesen Gründen werden die Möglichkeiten der Polymer-analogen Aminoalkylierung vorgestellt (Abb. 5.1). Mit aminogruppenhaltigen Reagenzien, wie z.B. Chloralkylaminen, ist zwar eine direkte Alkylierung des Polysaccharids möglich, die Entstehung von Nebenprodukte durch Tandemreaktionen ist jedoch wahrscheinlich. Die Länge des Substituenten und damit der Abstand zum Grundgerüst sind bei dieser Methode frei wählbar. In einer Patentschrift von 1979 wurde die Bildung von Aminoalkylpullulanethern durch Reaktion mit vielen Aminoalkylreagenzien wie 2-Aminopropylbromid oder 3-Amino-2-hydroxypropylchlorid im basischen Milieu beschrieben. Die Produktcharakterisierung erfolgte lediglich über Elementaranalyse und bei geladenen Substituenten durch konduktometrische Titration. Beide Verfahren ergaben unterschiedliche DS-Werte. Nebenreaktionen wurden nicht thematisiert, dabei sind

Tandemreaktionen bedingt durch die Nucleophilie der Aminogruppen der Produkte unvermeidlich.<sup>[134]</sup>

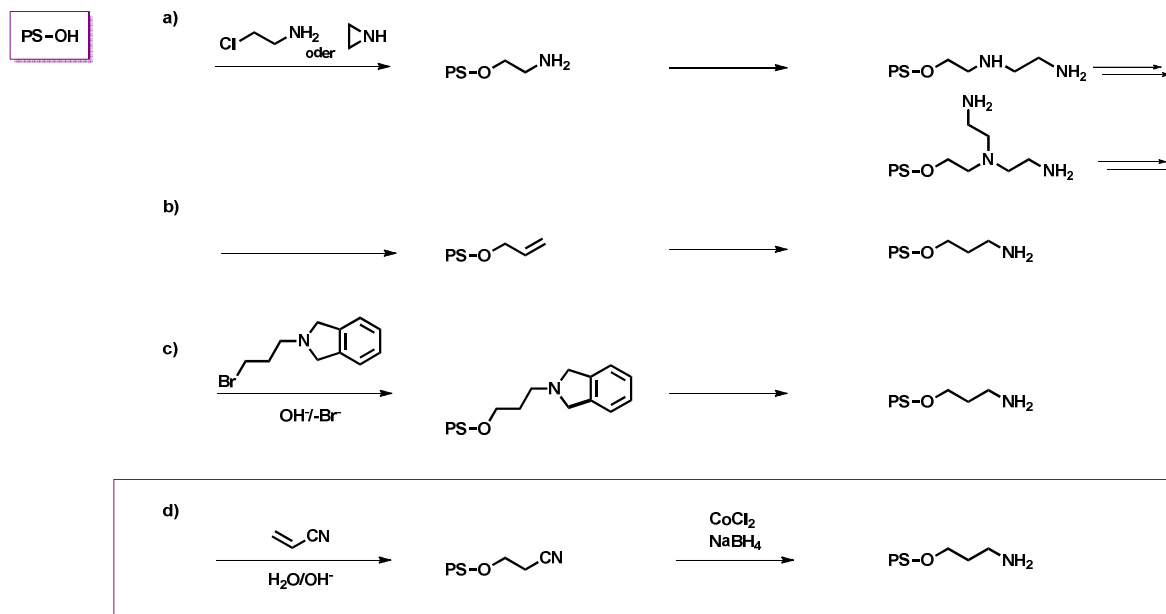


Abb. 5.1: Aminofunktionalisierung von Polysacchariden, (a) direkte Alkylierung mit Aminoalkylreagenzien, wie Alkylamin oder Ethylenimin und folgende Tandemreaktionen, (b) über reaktive Intermediate am Beispiel von Allylgruppen, (c) Veretherung eines Polysaccharids (Williamsonsche Ethersynthese) mit N-(3-Brompropyl)phthalimid und anschließende Entschützung zum primären Amin mit  $\text{NaBH}_4$ , (d) Reduktion von Cyanoethylgruppen.

Sollen ausschließlich primäre Aminofunktionen eingeführt werden, müssen mehrstufige Reaktionswege gewählt werden. Die Kopplung von N-geschützten Aminosubstituenten mit anschließender Entschützung oder auch die Einführung von Nitrilgruppen mit anschließender Reduktion sind geeignete Wege für einen kontrollierten Reaktionsverlauf. Gonera stellte in ihrer Arbeit die Williamsonsche Veretherung von Stärke mit verschiedenen Bromalkylphthalimiden vor. Die Entschützung erfolgte dort unter relativ milden Bedingungen ( $\text{NaBH}_4$ , Methanol/Wasser und Essigsäurehydrolyse unter Lactonbildung), sodass diese Methode auch für Polysaccharide geeignet war.<sup>[127]</sup> Die Abspaltung von typischen Schutzgruppen, wie z.B. *tert*-Butylcarbamoyl (N-BOC) erfolgt normalerweise unter saureren Bedingungen, wobei das Polysaccharid angegriffen werden würde. Aminopropylstärken wurden im Laborversuch erfolgreich als Papieradditiv zur Erhöhung der Nassfestigkeit sowie als Implantatbeschichtung und zur Stabilisierung von Enzymen verwendet.<sup>[56,58]</sup>

Bei der Einführung von Stickstoff über reaktive Intermediate werden zunächst funktionelle Gruppen, z.B. ein Alkinyler, in das Polymer eingeführt und mittels weiterer Reaktionen (z.B. Click-Reaktionen) mit einem Aminofunktion tragenden Reagenz gekoppelt. Bei diesem Vorgehen kann die Spacerlänge variiert werden.<sup>[135]</sup>

Riesler et al. setzten 6-Tosylcellulose mit verschiedenen Diaminen um. Die durch Substitution des Tosylats erhaltenen Aminocellulosen wurden zur Enzymimmobilisierung sowie zur Beschichtung von Glasoberflächen eingesetzt.<sup>[55]</sup>

Durch die Einführung von Stickstoff über Azido- oder Cyanoderivate mit nachfolgender Reduktion können die oben beschriebenen Nebenreaktionen vermieden werden. Die häufigsten Reduktionsmethoden sind die katalytische Hydrierung mit Wasserstoff und einem Metallkatalysator oder die Reaktion mit komplexen Metallhydriden, wie Natriumborhydrid oder Lithiumaluminiumhydrid.<sup>[136]</sup> Diese Prinzipien wurden zur Aminofunktionalisierung von Inulin<sup>[64]</sup>, Amylose und Stärke verfolgt.<sup>[127,128]</sup> Cyanoethylinulin konnte bei der Verwendung eines heterogenen Raney-Cobalt-Katalysators nur partiell reduziert werden, da es durch die Adsorption der Polymere und des polyfunktionalen Produkts zur Vergiftung des Katalysators kam. Die Reduktion mit Natriumborhydrid und Cobaltchlorid ergab eine Belegung von 90 %. Wurden Metalle (Natrium) in flüssigem Ammoniak mit Alkoholen als Protonendonoren eingesetzt, konnten 83 % der Cyanoethylgruppen in Aminopropylgruppen überführt werden, jedoch wurden 17 % der Substituenten abgespalten.<sup>[64]</sup> Daly und Mitarbeiter benutzten Boran-Dimethylsulfid in THF für die Reduktion von Cyanoethylcellulosen und erreichten eine vollständige Reduktion mit DS-Werten von 1,84 und 0,84.<sup>[125]</sup>

O-Aminopropylstärke konnte durch die Reduktion der Cyanoethylgruppen mit frisch hergestelltem Cobaltborid (aus Cobaltchlorid und Natriumborhydrid) dargestellt werden. Mit dieser Methode wurde eine Belegung von bis zu 90 % (bei einem  $DS_{CE} = 0,17$ ) erreicht. Die Reproduzierbarkeit wird jedoch als nicht zufriedenstellend beschrieben.<sup>[128]</sup> Im Rahmen einer Diplomarbeit wurde durch Optimierung dieser Reaktionsfolge Cyanoethyldextran zu den entsprechenden Aminopropyl-Derivaten (maximaler  $DS_{AP} = 1,53$ ) umgesetzt.<sup>[129]</sup>

Der Mechanismus der Reduktion konnte noch nicht geklärt werden. Zum einen können Metallionen ( $Co^{2+}$ ) durch Komplexbildung des Nitrils die Dreifachbindung aktivieren, wodurch ein Carbeniumion entsteht, welches mit dem Hydrid-Donor Tetrahydroborat ( $BH_4$ ) leicht wechselwirken kann. Zudem wird bei der Reaktion von  $NaBH_4$  und Cobalt(II)-chlorid schwarzes Cobaltborid gebildet, welches (zusätzlich) als heterogener Katalysator wirken kann und in Verbindung mit einem noch unbekannten Hydrid-Donor als treibende Kraft der Reduktion beschrieben wird.<sup>[137]</sup> In Nebenreaktionen entsteht metallisches Cobalt und das in der Reaktionsmischung vorhandene  $Co^{2+}$  bewirkt den Abbau von Borhydrid ( $BH_4^-$ ) zu Wasserstoff und Borat. Es ist notwendig,  $NaBH_4$  und Cobalt(II)-chlorid im Überschuss einzusetzen.

Nach der erfolgreichen Cyanoethylierung von Pullulan und Dextranen werden in diesem Kapitel die Ergebnisse der Reduktion zu den Aminopropylglucanen (APD, APP) vorge-

stellt. In Anlehnung an Cuber<sup>[129]</sup> wurden  $\text{CoCl}_2$  und  $\text{NaBH}_4$  im Verhältnis 1 : 3,4 eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen sind in den Tabellen 5.1 und 5.2 zusammengefasst.

Für die Reaktion wurden die *O*-Cyanoethylglucane und das Cobaltsalz eingewogen und in Wasser unter Rühren gelöst. Lag eine homogene rosafarbene Lösung vor, wurde eine wässrige Natriumborhydrid-Lösung dazugegeben. Wichtig war bei diesem Schritt (aufgrund des entstehenden Wasserstoffs) eine langsame und tropfenweise Zugabe. Durch kräftiges Rühren des Reaktionsgemisches konnte das auftretende Schäumen kontrolliert werden. Nach einer Stunde Reaktionszeit wurden die entstandenen schwarzen Partikel vorsichtig mit verdünnter Salzsäure bei Raumtemperatur gelöst. Eine übermäßige Zugabe von Säure sollte vermieden werden, damit keine Spaltung der Glucosylbindungen auftritt. Die Produktisolierung erfolgte mittels Dialyse und Gefriertrocknung.

In den folgenden Tabellen sind die Reaktionsbedingungen der Reduktion von Cyanoethylglucanen aufgeführt. Es sind bereits die resultierenden Aminopropyl-DS Werte aufgeführt, deren Analytik aber erst Gegenstand des nächsten Abschnitts (5.2) sein wird.  $D_{\text{red}}$  bezeichnet den Reduktionsgrad (Degree of Reduction siehe Gleichung (5.4)). Neben der vollständigen Reduktion wurden auch partielle Umsetzungen angestrebt, um Produkt mit Cyano- und Aminogruppen zu erhalten.

Tabelle 5.1: Bedingungen der Reduktion von CyanoethylDEXTRANEN mit  $\text{CoCl}_2/\text{NaBH}_4$  zu Aminopropylderivaten.

Ansatz	Edukt	Äquivalente/CE						Produkt			
		$\text{DS}_{\text{CE}}^{\text{a}}$	E [mg]	$\text{CoCl}_2$	$\text{NaBH}_4$	$\text{H}_2\text{O}$ [mL]	PS[mg/mL]	$\text{DS}_{\text{AP}}^{\text{NMR}^{\text{b}}}$	$\text{DS}_{\text{CE}}^{\text{verbleibend}^{\text{b}}}$	$\text{D}_{\text{red}} [\%]^{\text{c}}$	A [mg]
APD-6	CED-5	1,01	50	4,50	1,00	4	12,5	0,09	0,84	10	43
APD-16	CED-8	0,61	200	4,43	15,00	16	12,5	0,47	0,00	100	225
APD-18	CED-8	0,61	200	4,43	15,00	16	12,5	0,37	0,00	100	135
APD-19	CED-8	0,61	300	4,43	15,00	16	18,8	0,46	0,00	100	276
APD-15	CED-5	1,01	200	4,43	15,00	16	12,5	0,90	0,00	100	202
APD-17	CED-5	1,01	200	4,43	15,00	16	12,5	0,64	0,00	100	173
APD-32	CED-19	1,40	400	4,43	15,00	16	25,0	0,63	0,85	43	269
APD-33	CED-19	1,40	400	4,43	15,00	16	25,0	0,49	0,91	35	323
APD-27	CED-19	1,40	300	4,43	15,00	16	18,8	1,31	0,00	100	191
APD-23	CED-12	1,60	200	4,43	15,00	16	12,5	1,52	0,04	97	239
APD-14	CED-3	1,68	150	4,43	15,00	16	9,4	1,57	0,00	100	204
APD-10	CED-1	1,77	50	4,43	15,00	4	12,5	1,54	0,00	100	55
APD-11	CED-1	1,77	50	4,43	15,00	4	12,5	1,54	0,00	100	52
APD-12	CED-2	1,77	60	4,43	15,00	4	15,0	1,21	0,00	100	73
APD-13	CED-2	1,77	60	4,43	15,00	4	15,0	1,53	0,00	100	47
APD-22	CED-2	1,77	150	4,43	15,00	16	9,4	1,70	0,00	100	178
APD-20	CED-9	1,81	300	4,43	15,00	16	18,8	1,32	0,30	82	318
APD-21	CED-9	1,81	300	4,43	15,00	16	18,8	1,43	0,29	83	339
APD-24	CED-20	1,90	200	4,43	15,00	16	12,5	1,50	0,00	100	208
APD-26	CED-19	1,40	200	1,70	5,00	16	12,5	0,85	0,26	76	179
APD-25	CED-20	1,90	200	1,48	7,50	16	12,5	1,30	0,40	77	194
APD-28	CED-20	1,90	200	1,48	5,00	16	12,5	0,76	0,40	65	218
APD-30	CED-21	2,20	80	0,55	1,88	9	8,9	0,28	2,40	10	68
APD-31	CED-21	2,20	80	0,55	1,88	9	8,9	0,28	2,31	11	58
APD-29	CED-6	2,37	80	0,55	1,88	10	8,0	0,13	2,32	5	48

<sup>a</sup> berechnet aus  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum, Gleichung (4.1), <sup>b</sup> berechnet aus  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum, Gleichung (5.1 - 5.3), <sup>c</sup> Reduktionsgrad berechnet nach (5.4.).

Tabelle 5.2: Bedingungen der Reduktion von Cyanoethylpullulanen mit  $\text{CoCl}_2/\text{NaBH}_4$  zu Aminopropylderivaten.

Ansatz	Edukt	Äquivalente						Produkt			
		$\text{DS}_{\text{CE}}^{\text{a}}$	E [mg]	$\text{CoCl}_2$	$\text{NaBH}_4$	$\text{H}_2\text{O}$ [mL]	PS[mg/mL]	$\text{DS}_{\text{AP}}^{\text{NMR}^{\text{b}}}$	$\text{DS}_{\text{CE}}^{\text{verbleibend}^{\text{b}}}$	$\text{D}_{\text{red}}^{\text{c}}$	A [mg]
<b>APP-1</b>	CE-P-12	0,73	200	4,43	15,00	4	50	0,27	0,34	44	204
<b>APP-2</b>	CE-P-19	0,89	200	4,43	15,00	4	50	0,33	0,49	41	302
<b>APP-3</b>	CE-P-19	0,89	200	4,43	15,00	4	50	0,20	0,71	22	200
<b>APP-4</b>	CE-P-19	0,89	100	4,43	15,00	4	25	0,06	0,83	7	98
<b>APP-5</b>	CE-P-19	0,89	100	4,43	15,00	4	25	0,34	0,60	36	101

<sup>a</sup> berechnet aus  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum, Gleichung (4.3), <sup>b</sup> berechnet aus  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum, Gleichung (5.1 - 5.3), <sup>c</sup> Reduktionsgrad berechnet nach (5.4.).



## 5.2 Charakterisierung von Aminopropylglucanen

### IR-Spektroskopie

Die Infrarotspektroskopie ist für eine erste Kontrolle der Reduktion von Cyanoethylglucanen sehr gut geeignet. In Abb. 5.2 ist das Spektrum von Cyanoethyl-dextran CED-5 ( $DS_{CE} = 0,74$ , GC) dargestellt, welches vollständig zum APD-17 ( $DS_{AP} = 0,64$ ) reduziert wurde. Die Nitrilbande bei  $2250\text{ cm}^{-1}$  nimmt mit fortlaufender Reduktion ab und ist bei vollständigem Verlauf nicht mehr sichtbar. Neben den charakteristischen Valenzschwingungen der OH-Gruppen werden auch NH-Valenzschwingungen ( $3200\text{ bis }3550\text{ cm}^{-1}$ ) detektiert. Deutlich ist die Bande der NH-Deformationsschwingung bei  $1550\text{ cm}^{-1}$  zu erkennen.

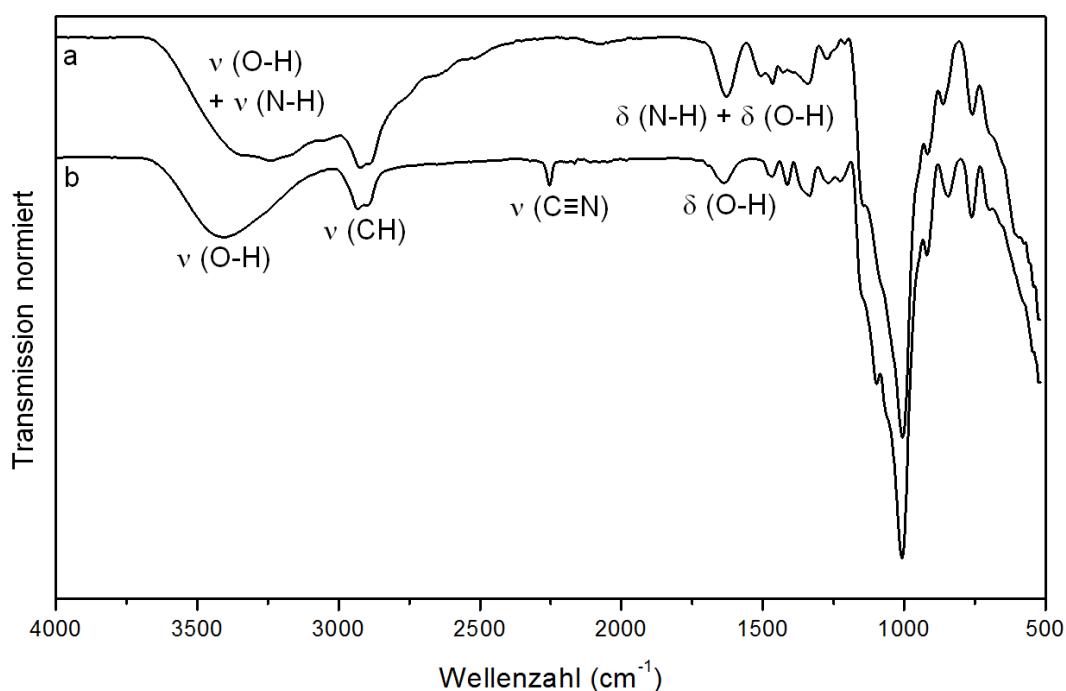


Abb. 5.2: ATR-IR-Spektrum des (a) Aminopropyldextrans APD-17 ( $DS_{AP} = 0,64$ ,  $DS_{Red} = 100\%$ ) im Vergleich zum Edukt (b) Cyanoethyl-dextran CED-5 ( $DS_{CE(EA)} = 0,86$ ).

### NMR-Spektroskopie

Die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie eignet sich zum einen zur Bestimmung der DS-Werte von Aminopropylpolysacchariden. Zum anderen kann auch noch der Reduktionsgrad ( $D_{red}$ ) bzw. der Anteil an verbliebenen Cyanoethylgruppen abgeschätzt werden. Für die Aufnahme der Spektren wurden jeweils ca. 10 mg der Aminopropyldextrane in  $\text{D}_2\text{O}$  gelöst.

Wie in Abb. 5.3 anhand des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von APD-15 ( $DS_{AP} = 0,90$ ) im Vergleich zum entsprechenden Cyanoethylglucan (CED-5) gezeigt, ist das Signal der Cyanoethyl-

gruppe (2,82 ppm) nach erfolgreicher Reduktion nicht mehr vorhanden. Es resultieren zwei Signale für die Protonen der  $\text{CH}_2$ -Gruppen mit einer Verschiebung von 3,12 bzw. 2,00 ppm. Durch den Einfluss der Aminogruppe ist die direkt gebundene Methylengruppe im Vergleich zur Methylengruppe in  $\beta$ -Stellung tieffeldverschoben. Die direkt an den Zucker gebundene Methylengruppe ( $-\text{OCH}_2$ ) liegt im Bereich der Zuckerringprotonen (3,35 - 4,25 ppm). Wie auch beim Cyanoethylderivat sind die  $H$ -1 Protonen bei 5,00 und 5,18 ppm (bei Substitution in Position 2) zu erkennen.

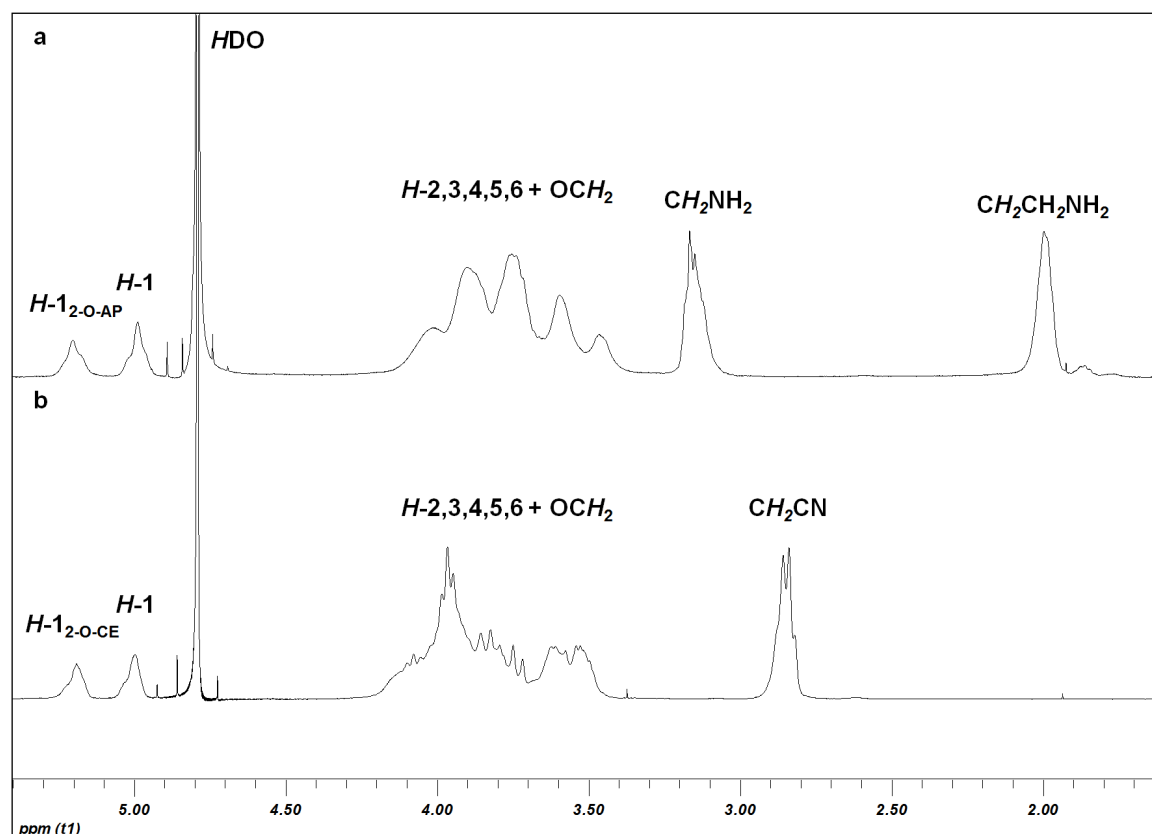


Abb. 5.3:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz) von (a) APD-15 ( $\text{DS}_{\text{AP}} = 0,90$ ,  $D_{\text{red}} = 100\%$ ) und (b) CED-5 ( $\text{DS}_{\text{CE}} = 1,01$ ).

Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum eines Aminopropylcyanoethylpullulans ( $\text{DS}_{\text{AP}} = 0,20$ ,  $\text{DS}_{\text{CE}} = 0,71$ ) ist im Vergleich zum entsprechenden Cyanoethylpullulan ( $\text{DS}_{\text{CE}} = 0,89$ ) in Abb. 5.4 gezeigt. Es wird deutlich, dass die Signale der  $H$ -1 Protonen schlecht aufgelöst sind.

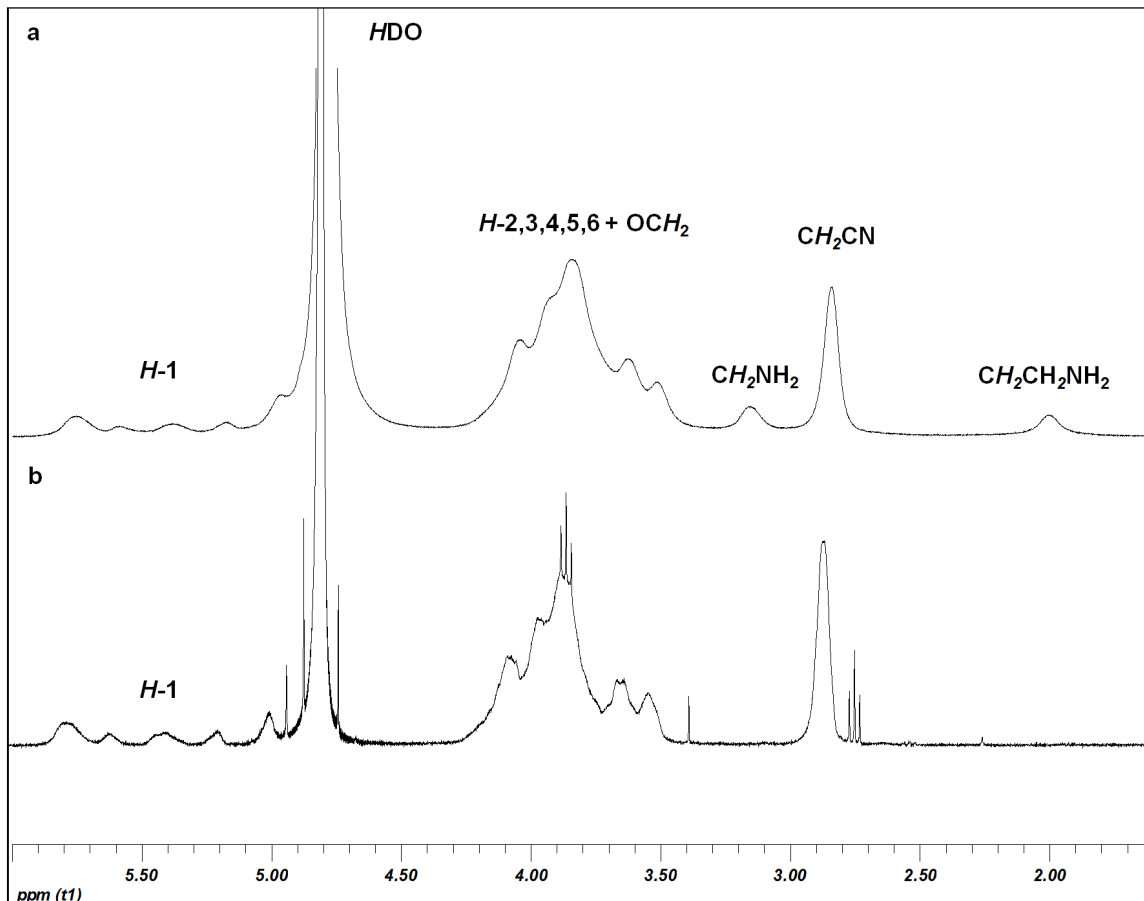


Abb. 5.4:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz) von (a) APP-3 ( $\text{DS}_{\text{AP}} = 0,20$ ,  $\text{DS}_{\text{CE}} = 0,71$ ), (b) der Vorstufe CEP-19 ( $\text{DS}_{\text{CE}} = 0,89$ ).

Der Aminopropylsubstitutionsgrad ( $\text{DS}_{\text{AP}}$ ) wird für Dextranderivate aus dem Verhältnis der Signale der freiliegenden Methylengruppen zur Summe der  $\text{H-1}$  Integrale (Gleichung (5.1)) berechnet.

$$\text{DS}_{\text{AP}} = \frac{1/4(\int \text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 + \int \text{CH}_2\text{NH}_2)}{\int \text{H1} + \int \text{H1}_{2-\text{O}-\text{CE}} + \int \text{H1}_{2-\text{O}-\text{AP}}} \quad (5.1)$$

Die Berechnung des bei teilreduzierten Derivaten verbleibenden  $\text{DS}_{\text{CE}}$  erfolgt nach Gleichung (5.2).

$$\text{DS}_{\text{CE}} = \frac{1/2 \int \text{CH}_2\text{CN}}{\int \text{H1} + \int \text{H1}_{2-\text{O}-\text{CE}} + \int \text{H1}_{2-\text{O}-\text{AP}}} \quad (5.2)$$

Bei teilreduzierten Cyanoethylderivaten mit einem hohen  $\text{DS}_{\text{CE}}$  und geringem  $\text{DS}_{\text{AP}}$  (= APD-28 bis 31, Tabelle 5.3) wurde  $\text{DMSO-}d_6$  als Lösungsmittel eingesetzt. Die Berechnung des  $\text{DS}_{\text{AP}}$ -Wertes erfolgte hier, indem die Integrale der Methylengruppen ins Verhältnis zu den Protonen des Zuckerrings (korrigiert um die enthaltene  $\text{O-CH}_2$ -Gruppe des AP- bzw. CE-Substituenten) gesetzt wurden (Gleichung (5.3)). Diese Art der Berechnung ist notwendig, da Signale der anomeren Protonen durch die Signale der in  $\text{DMSO-}d_6$

ebenfalls sichtbaren Hydroxylgruppen überlagert werden und nicht mehr separat integriert werden können. Auch bei den  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von Pullulan (Abb. 5.4) und bei schlecht aufgelösten NMR-Messungen (APD-17 und APD-18) ist diese Art der Berechnung vorteilhaft.

$$DS_{AP} = \frac{1/4(\int CH_2CH_2NH_2 + \int CH_2NH_2)}{1/6(\int H_{2,3,4,5,6_{a,b}} + OCH_2) - (1/2(\int CH_2CH_2NH_2 + CH_2NH_2 - \int CH_2CN))} \quad (5.3)$$

Der Reduktionsgrad ( $D_{red}$ ) kann durch das Verhältnis von Aminopropyl- und Cyanoethylsubstitution, wie in Gleichung (5.4) gezeigt berechnet werden.

$$D_{red}[\%] = \frac{DS_{AP}}{DS_{AP} + DS_{CE(neu)}} * 100 \quad (5.4)$$

### Elementaranalyse

Die DS-Bestimmung von Aminopropylderivaten mittels Elementaranalyse erfolgt gemäß Gleichung (5.5).

$$DS = \frac{(162,15 * N)}{(1401 - (58,12 * N))} \quad (5.5)$$

162,15:	molare Masse AGU
1401:	molare Masse Stickstoff x 100
58,12:	molare Masse Aminopropylsubstituent
N:	Stickstoffgehalt

Zusätzlich zu dieser direkten Berechnung (Gew.%) der DS-Wert auch hier zusätzlich aus dem C/N-Verhältnis berechnet, um Fehlinterpretationen aufgrund von Verunreinigungen oder Feuchtigkeit zu erkennen. In Tabelle 5.3 sind die Ergebnisse aus den Elementaranalysen ausgewählter Proben den mittels NMR-Spektroskopie berechneten DS-Werten gegenübergestellt.

Tabelle 5.3: Reduktion von Cyanoethylpolysacchariden, mit  $\text{NaBH}_4$  und  $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , vergleiche Tabelle 5.1 und 5.2.

Ansatz	Edukt	Produkt		$\text{DS}_{\text{CE}}^c$	$\text{D}_{\text{red}}^d$	EA	
		$\text{DS}_{\text{CE}}^a$	$\text{DS}_{\text{AP}}^b$			$\text{DS}_{\text{AP}}^e$	$\text{DS}_{\text{AP}}^f$
APD-6	CED-5	1,01	0,09	0,84	10	-	-
APD-10	CED-1	1,77	1,54	0,00	100	-	-
APD-11	CED-1	1,77	1,54	0,00	100	0,95	1,36
APD-12	CED-2	1,77	1,21	0,00	100	0,86	1,36
APD-13	CED-2	1,77	1,53	0,00	100	0,95	1,36
APD-14	CED-3	1,68	1,57	0,00	100	0,86	1,23
APD-15	CED-5	1,01	0,90	0,00	100	0,53	0,69
APD-16	CED-8	0,61	0,47	0,00	100	0,33	0,39
APD-17	CED-5	1,01	0,64	0,00	100	0,62	0,81
APD-18	CED-8	0,61	0,37	0,00	100	0,35	0,43
APD-19	CED-8	0,61	0,46	0,00	100	-	-
APD-20	CED-9	1,81	1,32	0,30	82	-	-
APD-21	CED-9	1,81	1,43	0,29	83	-	-
APD-22	CED-2	1,77	1,70	0,00	100	-	-
APD-23	CED-12	1,60	1,52	0,04	97	-	-
APD-24	CED-20	1,90	1,50	0,00	100	-	-
APD-25	CED-20	1,90	1,30	0,40	77	-	-
APD-26	CED-19	1,40	0,85	0,26	76	-	-
APD-27	CED-19	1,40	1,31	0,00	100	-	-
APD-28	CED-20	1,90	0,76	0,40	65	-	-
APD-29	CED-6	2,37	0,13	2,32	4	-	-
APD-30	CED-21	2,20	0,28	2,40	9	-	-
APD-31	CED-21	2,20	0,28	2,31	9	-	-
APD-32	CED-19	1,40	0,63	0,85	43	-	-
APD-33	CED-19	1,40	0,49	0,91	35	-	-
APP-1	CEP-12	0,73	0,27	0,34	45	-	-
APP-2	CEP-19	0,89	0,33	0,49	41	-	-
APP-3	CEP-19	0,89	0,20	0,71	21	-	-
APP-4	CEP-19	0,89	0,06	0,83	6	-	-
APP-5	CEP-19	0,89	0,34	0,60	36	-	-

<sup>a</sup> berechnet aus  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum nach Gleichung (4.1) bzw. (4.3), <sup>b</sup> berechnet aus  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum nach Gleichung (5.1), APD-29-31, APD-17-18 und APP-1-5 wurden mit Gleichung (5.3) berechnet, <sup>c</sup> berechnet aus  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum nach Gleichung (5.2), <sup>d</sup> berechnet nach Gleichung (5.4), <sup>e</sup> berechnet aus EA (basierend auf N-Gehalt Gleichung (5.5), <sup>f</sup> berechnet aus EA (basierend auf C/N-Verhältnis).

Die Ergebnisse der Versuchsansätze APD-10 bis 19, 22, 24 und 27 zeigen, dass die Reduktion der Nitrilgruppe zu 100 % erfolgte, wenn 4,43 eq Cobaltchlorid und 15 eq Natriumborhydrid pro Cyanoethylsubstituent bei einer Konzentration von 9 bis 19 mg Polysaccharid/mL eingesetzt wurden. Eine Ausnahme stellen APD-20 und 21 dar. Die unvollständige Reduktion lag wahrscheinlich an Eduktresten, die an der Glaswand klebten und somit nicht umgesetzt wurden. Für die Ansätze APD-32 und 33 liegen Reduktionsgrade von 43 und 35 % vor. Bei diesen Ansätzen könnte die nur partielle Reduktion durch eine schlechtere Löslichkeit auf Grund des relativ hohen  $\text{DS}_{\text{CE}} = 1,40$  oder eine schlechtere Durchmischung aufgrund der höheren Konzentration des Cyanoethyldextrans im Reaktionsmedium begründet sein (25 mg/mL). Die Reduktion der Cyanoethylpullulane

erfolgte mit 6 - 45 % nur teilweise. Für die Reduktion von Cyanoethylamylosen wurde ebenfalls eine schlechte Reproduzierbarkeit beschrieben.<sup>[128]</sup> In weiteren Arbeiten könnte der Einfluss von Viskosität bzw. Konzentration des Polysaccharids und der Einfluss der  $\text{NaBH}_4$ -Zugabe untersucht werden. Gerade in heterogenen Reaktionsmedien könnte z.B. die Geschwindigkeit der Zugabe von Bedeutung sein.

Verraest et al. beschrieben eine vollständige Reduktion bei der die Cyanoethylgruppen in primäre Amine überführt wurden, aber auch einen Substituentenverlust von 17 % durch Dealkylierung bei der Reduktion von Cyanoethylulinen mit Natriumborhydrid und Cobaltchlorid in Ammoniak-Methanol-Lösung. Zur Produktcharakterisierung wurden dort NMR-Spektroskopie und Gelpermeationschromatographie angewandt.<sup>[64]</sup>

Werden die in dieser Arbeit durchgeführten Bestimmungsmethoden des DS-Wertes miteinander verglichen, so zeigt sich, dass (wie auch bei den Cyanoethylderivaten) mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie die höchsten DS-Werte erhalten wurden. Bei einer vollständigen Reduktion sollte es keine Unterschiede zwischen dem ausgehenden  $\text{DS}_{\text{CE}}$ -Wert und dem resultierenden  $\text{DS}_{\text{AP}}$ -Wert (bzw. der Summe aus  $\text{DS}_{\text{AP}}$  und verbliebenem  $\text{DS}_{\text{CE}}$ -Wert bei verbleibenden Cyanogruppen) geben (vergleiche Tabelle 5.3). Differenzen treten vor allem bei Derivaten mit  $\text{DS} < 1,5$  auf. Dies kann zum einen mit der schlechteren Integrierbarkeit von kleineren Signalen bei der Auswertung von NMR-Spektren oder, wie schon bei den Cyanoethylglucanen diskutiert, den verwendeten Lösungsmitteln bzw. dem Solvationszustand zusammenhängen (vergleiche 4.2). Zum anderen kann auch ein Substituentenverlust während der Reduktion, durch  $\beta$ -Eliminierung (Retro-Michael-Addition) die Ursache sein. Unter alkalischen Reaktionsbedingungen wird die Eliminierung von Acrylnitrilgruppen gefördert. Die geringen Auswaagen (Tabelle 5.1 und 5.2) sind eventuell auf hydrolytische Prozesse durch die Zugabe der Salzsäure zurückzuführen.

Die Berechnung des DS-Wertes aus dem Stickstoffgehalt liefert die niedrigsten Werte. Es zeigt sich wie wichtig es ist, die in der Literatur oft nicht beachtete Überprüfung durchzuführen, ob sich die aus dem DS-Wert ergebende mittlere Zusammensetzung auch mit den Analysendaten zusammenpasst, der DS also plausibel ist. Die Kontrolle zeigt hier, dass die Werte voneinander abweichen. Bei der Berechnung über den Stickstoffgehalt liegen geringere Werte vor, als bei der Bestimmung über das C/N-Verhältnis.

Langwierige gaschromatographische Untersuchungen wurden nicht durchgeführt, da die Substituentenverteilung bereits von den Cyanoethylderivaten bekannt ist und zudem das Problem besteht, dass die Trennung für die entsprechend aufgearbeiteten Derivate (Hydrolyse und Trimethylsilylierung) schlecht ist. Nur die Peaks für monosubstituierte Bausteine können gut getrennt werden, wie es Gonera anhand von *O*-Aminopropylstärke zeigte.<sup>[128]</sup> Die dort untersuchten Derivate hatten  $\text{DS}_{\text{AP}}$ -Werte von maximal 0,29 für Stärke und 0,37 für Amylose und lagen damit weit unter den Werten der hier vorgestellten

Aminopropylglucane. Bereits bei disubstituierten Glucosen zeigt das Gaschromatogramm starke Überlagerungen und selbst mittels der Analyse von charakteristischen Ionenspuren in der GC-MS-Analytik kann keine befriedigende Auflösung für die einzelnen Substitutionsmuster erfolgen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Reaktionsfolge Cyanoethylierung → Reduktion gut geeignet ist, um eine Aminofunktionalisierung von Glucanen durchzuführen. Das Polysaccharidrückgrat bleibt intakt. Wenn gewünscht kann auch nur eine Teilreduktion bewirkt werden.

Die relevanten DS-Werte  $DS_{CE}$  und  $DS_{AP}$  können mittels NMR-Spektroskopie bestimmt und aus ihnen der Reduktionsgrad ( $D_{red}$ ) berechnet werden. Die Elementaranalyse ergab auf Basis des Stickstoffgehaltes deutlich tiefere Werte, die aber bei Berücksichtigung des C/N-Verhältnisse nach oben korrigiert werden konnten. Somit stehen Aminopropyl-dextrane und -pullulane in einem weiten DS-Bereich als vollständig reduziert oder teilreduzierte Verbindungen mit variablen  $DS_{CE}$  für weiter Studien zur Verfügung.

## 6 Modifizierung von Aminopropylglucanen mittels reduktiver Aminierung

Im Folgenden werden der Reaktionsmechanismus der reduktiven Aminierung und mögliche Anwendungsgebiete der gebildeten Produkte sowie die strukturelle Charakterisierung der modifizierten Aminopropylglucane vorgestellt.

### 6.1 Reduktive Aminierung von Polysacchariden

Als reduktive Aminierungen wird die Reaktion von Carbonylverbindungen mit Ammoniak oder primären Aminen bezeichnet, bei der im Produkt die Carbonylfunktion durch eine Aminoalkylgruppe ersetzt wird. In der Kohlenhydratchemie wird die reduktive Aminierung zumeist zum Markieren (Labeling) des reduzierenden Endes (Aldehydfunktion) mit aminofunktionalisierten Chromo- und Fluorophoren eingesetzt.<sup>[60,138,139]</sup>

In der vorliegenden Arbeit sind die Aminogruppen jedoch am Polymer gebunden, während die zu koppelnden Moleküle die Aldehydfunktion tragen. Das Amin reagiert nach nucleophiler Addition an die Carbonylgruppe unter Eliminierung von Wasser zu einer Schiffschen Base. Im zweiten, irreversiblen Reaktionsschritt findet die Reduktion zum primären oder sekundären Amin durch das Reduktionsmittel statt (siehe Abb. 6.1).

Der Additionsschritt an die Carbonylgruppen ist säurekatalysiert. Brønsted-Säuren erhöhen deren Polarisierung und beschleunigen so die Anlagerung des Amins. Durch Protonierung wird aus der Hydroxylgruppe eine gute Abgangsgruppe. Es resultiert ein Carbenium-Iminium-Ion. Der pH-Wert des Reaktionsmediums sollte daher an den  $pK_a$ -Wert des Amins ( $-NRH_2^+$ ) angepasst sein, aber nicht darunter liegen.<sup>[138]</sup> Ist das Reaktionsmedium zu sauer, so verlangsamt sich die Reaktion durch die Protonierung und die damit erniedrigte Nucleophilie des Amins.

Sun und Mitarbeiter entwickelten entsprechende kinetische und thermodynamische Theorien für die Reaktionsbedingungen von primären Aminen mit dem reduzierenden Ende von Polysacchariden.<sup>[140]</sup> Bei den üblichen reduktiven Aminierungen, bei denen das reduzierende Ende des Kohlenhydrats als Aldehydfunktion dient, werden zumeist große molare Überschüsse an Amin eingesetzt, um schnelle Umsatzraten zu erzielen und die Bildung tertiärer Amine durch Konkurrenz des Primärproduktes mit dem Aminreagenz um die Carbonylkomponente zu verhindern.



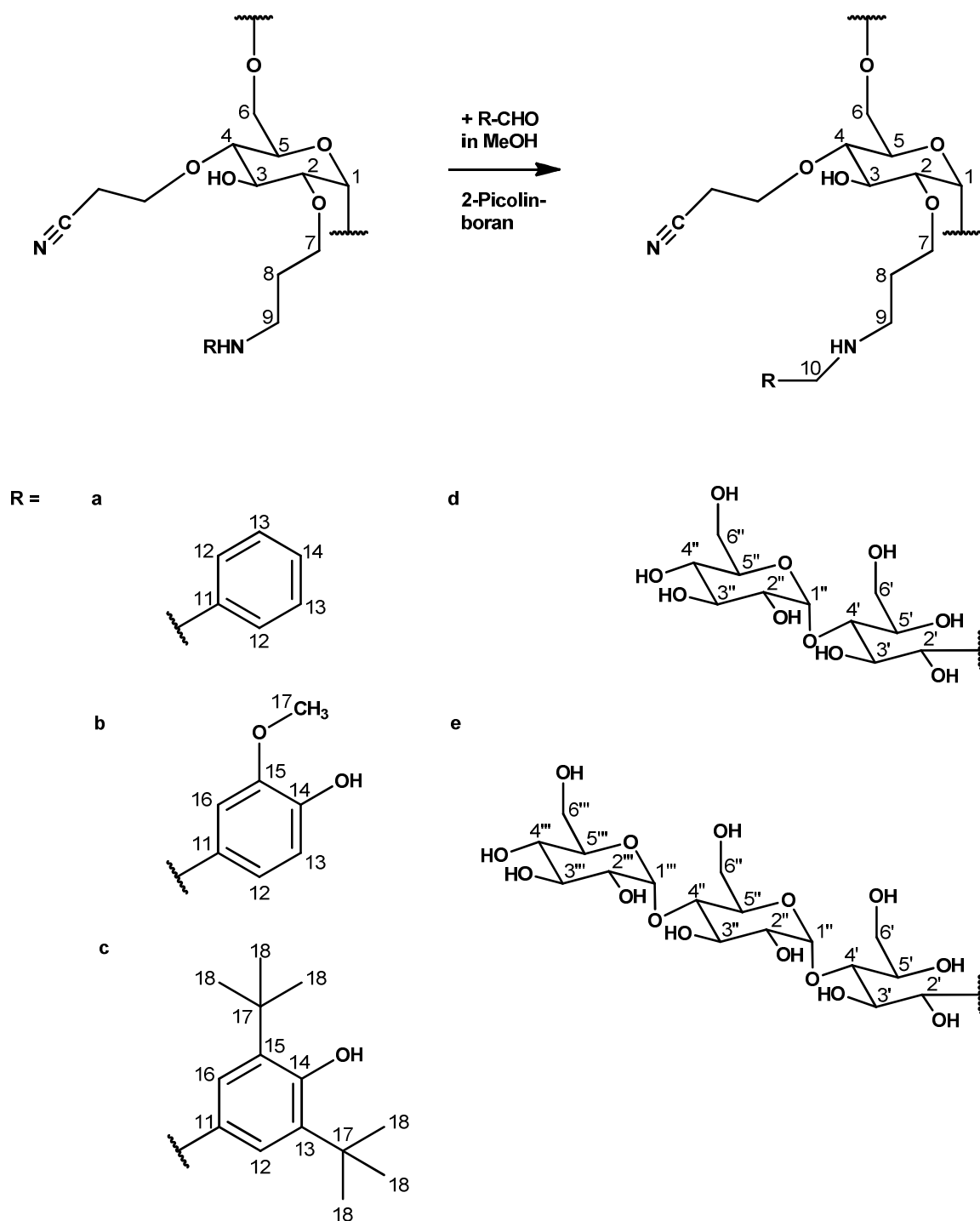


Abb. 6.1: Kopplung von Aldehyden mit Aminopropyldextranen mittels reduktiver Aminierung: (a) Benzaldehyd, (b) 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd (Vanillin), (c) 3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxybenzaldehyd (BHT-CHO), (d) Maltose oder (e) Maltotriose.

Die Wahl eines geeigneten Reduktionsmittels ist sehr wichtig, wie Ruhaak und Mitarbeiter erarbeitet haben. Basierend auf ihren Ausführungen wurde für die vorliegende Arbeit ein Picolin-Boran-Komplex, als relativ günstiges, nichttoxisches, mildes und stabiles Reduktionsmittel eingesetzt. Zudem ist die Chemoselektivität dieser Verbindung von Vorteil, Carbonylfunktionen werden nicht reduziert.<sup>[141]</sup> Bisher werden die Reaktionsbedingungen an die verwendeten Reagenzien angepasst. So wurden beispielsweise die

Reaktionsbedingungen (Lösungsmittelzusammensetzung, Temperatur, pH-Wert, Zeit) für die Bindung von fluoreszierenden Aminen (2-Aminobenzamide und Anthranilsäure) an die reduzierenden Enden von Glucanen, in einem Reaktionsmedium aus DMSO und Eisessig, einzeln optimiert. Auch hier wurde ein Aminüberschuss verwendet.<sup>[142]</sup>

Sato und Mitarbeiter setzten hingegen für die reduktive Aminierung äquimolare Anteile von Amin, Carbonylverbindungen und Reduktionsmittel (Picolinboran) ein. Eine Vielzahl von aromatischen und Alkylverbindungen wurden umgesetzt. Es wurde MeOH/AcOH (10 : 1, v/v) als Reaktionsmedium verwendet. Aber auch die Reaktion in Wasser war erfolgreich. Die Rolle von Wasser in der reduktiven Aminierung ist dabei noch nicht ganz verstanden. Es wird angenommen, dass die Bildung von Iminiumionen und damit die hydrophobe Assoziation von Aminen, Carbonylkomponenten und Reduktionsmittel unterstützt wird.<sup>[143]</sup> Unterierse empfiehlt für ein quantitatives Labeling von Cellooligomeren die Umsetzung mit *ortho*-Aminobenzoesäure in einem Reaktionsmedium aus Wasser, Methanol (zum Lösen des Amins) und Eisessig (3,3 : 2 : 1, v/v/v). Amin und Reduktionsmittel wurden nur in einem geringen Überschuss (je 2 eq) eingesetzt, um die Probenkontamination gering zu halten. Die Entfernung von Wasser im Aufarbeitungsschritt wurde als essentiell für eine komplette Umsetzung beschrieben.<sup>[138]</sup>

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten reduktiven Aminierungsreaktionen ist die Aminokomponente das Polysaccharid (damit polyfunktional), während die monomere Aldehydkomponente als Label fungiert. Der übliche Einsatz des Amin im Überschuss ist daher nicht möglich. Es wurde hingegen ein Überschuss an zu koppelndem Aldehyd eingesetzt. Damit war eine mehrfache Anlagerung des Aldehyds begünstigt. Als Reduktionsmittel wurde Picolinboran mit 2 eq/Amin eingesetzt. Nach den Literaturempfehlungen sollte der pH-Wert nach dem  $pK_a$ -Wert des Amins gewählt werden.<sup>[140]</sup> Da hier Aminopropyldextrane mit einem  $pK_a$ -Wert im Bereich von 10 - 11 ( $pK_a$ -Wert von Propylamin = 10,57), als Aminokomponente vorlagen, sollte es nur einen geeigneten pH-Bereich geben. Um den Einfluss des pH-Wertes auf die Reaktion der verwendeten Aldehydkomponenten zu testen wurden die Reaktion bei verschiedenen pH-Werten erprobt.

Im Folgenden werden die Versuche zur reduktiven Aminierung von Aminopropyldextranen mit den in Abb. 6.1 gezeigten Aldehyden vorgestellt. Die Versuchsbedingungen basieren auf den Arbeiten zur Markierung von Oligomeren für die Massenspektroskopie von Unterierse.<sup>[138]</sup> Verschieden hoch substituierte Aminopropyldextrane, in einigen Fällen nur teilreduziert und damit mit Cyanoethylgruppen versehen, wurden mit den Reaktionspartnern Benzaldehyd (Bn), Vanillin (Van, 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd), 3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxy-benzaldehyd hemihydrat (BHT, Aldehydform von Di-*tert*-Butylhydroxytoluol), Maltose ( $G_2$ ) und Maltotriose ( $G_3$ ) umgesetzt. Die Reaktionsbedingungen sind in

Tabelle 6.1 zusammengefasst und werden am Ende des Kapitels nach den Ausführungen zur strukturellen Charakterisierung der Kopplungsprodukte diskutiert (vergleiche auch 10.3.4). Allgemein wurde das Aminopropylglucan eingewogen und mit Methanol unter kräftigem Rühren gelöst (bzw. dispergiert). Der ebenfalls in Methanol gelöste Aldehyd wurde zugegeben und der pH-Wert des Reaktionsgemisches mit verdünnter HCl oder NaOH eingestellt. Die Ansätze wurden 3 h bei 40 °C gerührt, wobei in allen Fällen eine vollständige Lösung des Polysaccharids eintrat. Als Reduktionsmittel wurde eine methanolische Lösung von Picolinboran eingesetzt, welche in zwei Schritten zum Reaktionsgemisch gegeben wurde, wobei zwischen den Zugaben 45 min Reaktionszeit bei 40 °C lagen. Bei Probe G<sub>2</sub>-7 und G<sub>2</sub>-8 wurde das Reduktionsmittel in drei Schritten zugegeben. Die Konzentration des Reduktionsmittels wurde so gewählt, dass immer doppelt so viele Äquivalente an Picolinboran, wie an Aldehyd pro Aminogruppe eingesetzt wurden. Im Fall von BHT-6 wurden die Reaktionszeiten verlängert. Nach der pH-Werteinstellung wurde der Ansatz für 24 h bei 40 °C gerührt. Die Zugabe von Picolinboran erfolgte in zwei Schritten. Die Gesamt-Reduktionszeit betrug bei diesem Ansatz 29 h. Die Reinigung erfolgte mittels Dialyse und bei der Verwendung von BHT mittels Extraktion des überschüssigen Aldehyds mit Petrolether und anschließender Dialyse. Die Reinheit der isolierten Produkte wurde mittels Dünnschichtchromatographie überprüft.

Ziel der Versuche war es eine möglichst hohe Kopplungsrate von Aldehyd an Aminopropyl-dextran zu erreichen. Zu diesem Zweck wurden der pH-Wert des Reaktionsmediums und die Äquivalente an Aldehyd variiert.

Tabelle 6.1: Reaktionsbedingungen zur Kopplung von Aldehyden an Aminopropyldextran mittels reduktiver Aminierung mit Picolinboran.

Ansatz	Edukt			E	Aldehyd		MeOH	Picolinboran		MeOH	pH	A	%RA <sup>a</sup>	R/AP <sup>b</sup>	DS <sub>RA</sub> <sup>c</sup>
	APD-	DS <sub>CE</sub>	DS <sub>AP</sub>	[mg]	eq/NH <sub>2</sub>	[mg]	[mL]	eq/NH <sub>2</sub>	[mg]	[mL]		[mg]			
<b>Bn-1</b>	23	0,04	1,52	10	1,0	6	1	2	13	1	4	13	23	0,23	0,35
<b>Bn-2</b>	23	0,04	1,52	10	4,0	26	1	8	52	1	4	12	61	0,61	0,92
<b>Bn-3</b>	23	0,04	1,52	10	10,0	65	1	20	131	1	4	17	103	1,03	1,56
<b>Bn-4</b>	32	0,85	0,63	20	10,0	68	2	20	136	1	4	19	105	1,05	0,66
<b>Bn-5</b>	33	0,91	0,49	20	10,0	55	2	20	110	1	4	17	91	0,91	0,45
<b>Bn-6</b>	30	2,40	0,28	21	10,0	35	1	20	71	1	4	16	8	0,08	0,02
<b>BHT-5</b>	27	0,00	1,31	60	10,0	778	2	20	710	2	4	48	12	0,12	0,15
<b>BHT-6</b>	27	0,00	1,31	40	2,0	104	2	4	95	2	4	57	53	0,53	0,70
<b>Van-2</b>	17	0,00	0,64	30	4,0	59	3	8	83	2	4	29	53	0,53	0,34
<b>Van-3</b>	17	0,00	0,64	30	8,0	118	3	16	165	4	4	22	58	0,58	0,37
<b>Van-7</b>	16	0,00	0,47	30	2,0	23	6	4	32	2	8	12	5	0,05	0,02
<b>Van-11</b>	23	0,04	1,52	20	1,0	19	1	2	26	1	4	19	33	0,33	0,50
<b>Van-12</b>	23	0,04	1,52	20	0,8	15	1	1,6	21	2	4	20	34	0,34	0,51
<b>Van-13</b>	16	0,00	0,47	30	10,0	114	2	20	160	1	4	26	103	1,03	0,48
<b>Van-14</b>	32	0,85	0,63	25	10,0	121	2	20	170	1	4	25	77	0,77	0,48
<b>Van-15</b>	33	0,91	0,49	25	12,0	118	2	24	165	1	4	25	92	0,92	0,45
<b>Van-16</b>	31	2,31	0,28	45	6,0	65	3	12	91	1	4	41	43	0,43	0,12
<b>G<sub>2</sub>-1</b>	19	0,00	0,46	20	4,0	67	3	8	42	2	3	16	15	0,15	0,07
<b>G<sub>2</sub>-2</b>	19	0,00	0,46	20	4,0	67	3	8	42	2	7	19	18	0,18	0,08
<b>G<sub>2</sub>-3</b>	19	0,00	0,46	20	4,0	67	3	8	42	2	9	16	78	0,78	0,36
<b>G<sub>2</sub>-4</b>	17	0,00	0,64	30	4,0	132	3	8	83	2	9	39	58	0,58	0,37
<b>G<sub>2</sub>-5</b>	22	0,00	1,70	30	4,0	270	3	8	168	2	9	32	47	0,47	0,81
<b>G<sub>2</sub>-6</b>	23	0,04	1,52	30	4,0	251	3	8	157	2	9	33	46	0,46	0,70
<b>G<sub>2</sub>-7</b>	22	0,00	1,70	30	4,0	270	3	8	168	2	9	33	70	0,7	1,19
<b>G<sub>2</sub>-8</b>	23	0,04	1,52	30	4,0	251	3	8	157	2	9	25	59	0,59	0,90
<b>G<sub>3</sub>-1</b>	18	0,00	0,37	25	4,0	102	3	8	43	2	9	44	45	0,45	0,17

<sup>a</sup> durchschnittlicher Belegungsgrad Aminogruppe, <sup>b</sup> Verhältnis Aldehyd/AP, <sup>c</sup> DS-Wert des Dextrans bezogen auf den gekoppelten Aldehyd.

## 6.2 Charakterisierung von reduktiv aminierten Polysacchariden

Zur Analyse der mittels reduktiver Aminierung funktionalisierten Dextrane wurde neben den bereits vorgestellten spektroskopischen Methoden (IR- und NMR-Spektroskopie) noch die massenspektrometrische Analyse (ESI-MS) nach Hydrolyse bzw. Methanolyse durchgeführt, um die kovalente Bindung der Aldehyde zu zeigen.

### 6.2.1 *N*-Benzyl-aminopropyldextran

Bei Benzaldehyd handelt es sich um den einfachsten aromatischen Aldehyd. Das ATR-IR-Spektrum des Kopplungsproduktes Bn-3 (Tabelle 6.1) von Aminopropyldextran mit dem Aromastoff ist in Abb. 6.2 im Vergleich zu einem Aminopropyldextran (APD-17) dargestellt. Das *O*-(*N*-Benzyl)-3-aminopropyldextran (Bn-3) zeigt neben der dominanten O-H-Valenzschwingung ( $3339\text{ cm}^{-1}$ ) bei  $3058$  und  $3020\text{ cm}^{-1}$  deutlich die aromatischen C-H-Banden. Nach den aliphatischen Valenzschwingungen der C-H- bzw.  $\text{CH}_2$ -Gruppen bei  $2924$ ,  $2872$  und  $2791\text{ cm}^{-1}$  sind in dem in Abb. 6.2 gezeigten (b) Spektrum die charakteristischen Ringschwingungen bei  $1591$  und  $1491\text{ cm}^{-1}$  sehr gut zu erkennen. Die für einen monosubstituierten Aromaten typischen C-H-Deformationsschwingungen sind bei  $733$  und  $699\text{ cm}^{-1}$  deutlich nachweisbar und bestätigen somit diesen Substitutionstyp.

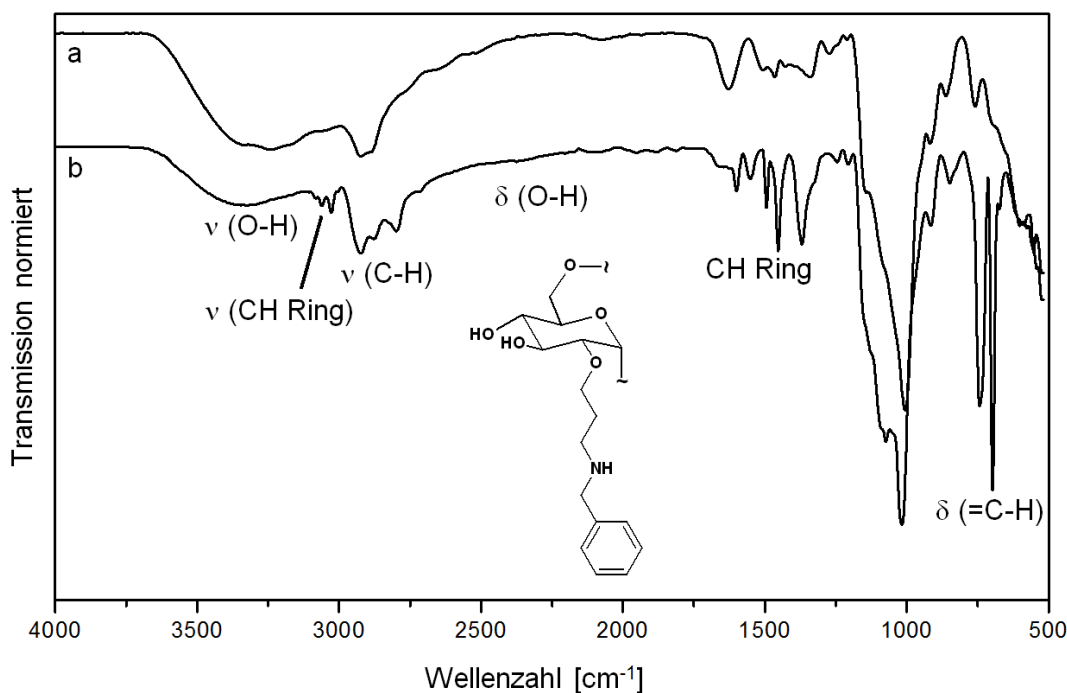


Abb. 6.2: ATR-IR-Spektrum von (a) Bn-3 ( $\text{DS}_{\text{Bn}} = 1,56$ ) und einem Aminopropyldextran (b) APD-17 ( $\text{DS}_{\text{AP}} = 0,64$ ).

Die kovalente Bindung von Benzaldehyd an Aminopropyl-dextran mittels reduktiver Aminierung lässt sich durch  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren belegen (Abb. 6.3). Die aromatischen Protonen ( $H$ -12, 13, 14) ergeben ein breites, nicht aufgelöstes Signal mit einer chemischen Verschiebung von 7,40 ppm. Die Signale der Methylengruppen sind durch die Modifizierung sowie durch die damit verbundene Veränderung der Löslichkeit verbreitert und verschoben. Neben den zwei Signalen der Methylengruppen des Aminopropylrestes können nach reduktiver Aminierung die Signale des un-, des einfach und des zweifach substituierten Aminopropylrestes vorliegen ( $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-Bn}$ ,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-Bn}$ ,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N(Bn)}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N(Bn)}_2$ ).

Werden Aminopropylcyanoethyl-derivate eingesetzt, liegen die Signale der zur Cyanoethylgruppe benachbarten Methylengruppen ebenfalls in diesem Bereich ( $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CN}$  und  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CN}$ ). Eine differenzierte, quantitative Auswertung dieser Signale im Bereich von 2,00 bis 3,00 ppm ist dadurch erschwert. Die „verbrückende“ Methylengruppe zwischen Aldehydrest und Amin hat eine chemische Verschiebung von etwa 3,8 ppm.<sup>[144]</sup> Damit fällt das Signal dieser Gruppe in den Bereich der Zuckerringprotonen.

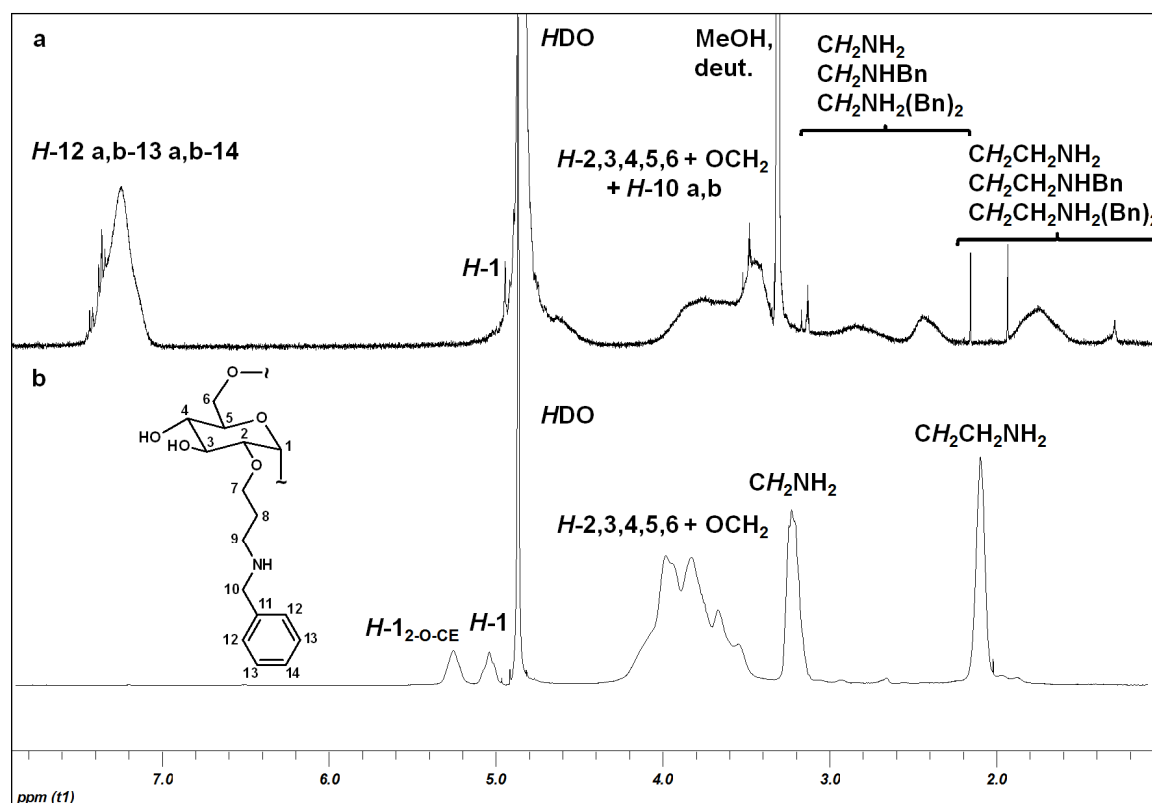


Abb. 6.3:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren (400 MHz) von (a) Bn-3 ( $\text{DS}_{\text{Bn}} = 1,56$ ) in  $\text{MeOH-d}_4$  im Vergleich zum eingesetzten Aminopropyl-dextran APD-23 in  $\text{D}_2\text{O}$  ( $\text{DS}_{\text{AP}} = 1,52$ ).

Beim Vergleich von Probe Bn-3 (Abb. 6.3) mit dem Ausgangs-Aminopropyl-dextran werden Überlagerungen und Signalverbreiterung besonders deutlich. Die Signale der anomeren Protonen sind nicht mehr erkennbar. Der Vergleich mit weiteren NMR-Spektren

(z.B. Abb. 6.6) lässt die Annahme zu, dass die  $H$ -1 Protonen bei schlecht aufgelösten Spektren mit dem HDO-Signal zusammenfallen.

Eine weitere Vermutung wäre, dass die reduzierenden Enden der Glucane ebenfalls reduktiv aminiert wurden wodurch es zu einer Vernetzung bzw. Molmassenerhöhung kommen sollte. Dies müsste weiter überprüft werden.

Für die Berechnung des Substitutionsgrades ( $DS_{Bn}$ ) wird zunächst das Integral der aromatischen Protonen ( $H_{arom}$ ) durch die Anzahl Ringprotonen dividiert (5 bei Benzaldehyd) und in Bezug zur Hälfte des Integrals der Methylengruppe (= 2 Protonen) gesetzt (Gleichung (6.2)). Es wird die Methylengruppe im Bereich von  $\delta = 1,80$  bis  $2,00$  ppm zur Berechnung gewählt, da diese in den meisten Spektren besser isoliert ist. Durch Multiplikation mit dem Faktor 100 wird der prozentuale Belegungsgrad (Gleichung (6.1)) erhalten, wobei jedoch berücksichtigt werden muss, dass dies aufgrund von Disubstitutionen ( $-N(Bn)_2$ ) nicht der Belegung der AP-Gruppen, sondern dem durchschnittlichen Belegungsgrad Bn/AP bzw. dem molaren Benzaldehyd-Aminopropyl-Verhältnis entspricht. Der  $DS_{Bn}$ -Wert wird, wie in Gleichung (6.2) gezeigt, bezogen auf den vorausgehenden  $DS_{AP}$  des eingesetzten Dextranderivats berechnet.

$$BA [\%] = \frac{1/5 \int H_{arom}}{1/2 \int CH_2} * 100 \quad (6.1)$$

$$DS_{BA} = \frac{DS_{AP}}{100} * BA [\%] \quad (6.2)$$

Nach Hydrolyse von *N*-Benzyl-aminopropyl-dextran (Abschnitt 10.3.4) liegen Glucosebausteine vor, die als mögliche Substituenten Aminopropylgruppen (AP), Aminopropylgruppen gekoppelt mit einem Molekül Benzaldehyd oder sogar disubstituierte Aminopropylreste tragen können.

In Abb. 6.4 ist ein Ausschnitt der ESI-MS Analyse von Bn-3 gezeigt. Detektiert werden die  $[M+H]^+$  Addukte, da der Stickstoff für eine bevorzugte Protonierung sorgt. Kohlenhydrate an sich bilden primär Natrium-Addukte. Die Inkremente betragen pro Aminopropylrest 57 und pro gekoppeltem Molekül Benzaldehyd 90. Die *N*-Benzilylierung von Benzaldehyd mittels reduktiver Aminierung verlief erfolgreich, wie beispielsweise das Signal 328,2 für eine Glucoseeinheit mit einem Aminopropylrest und einem gekoppelten Aldehyd zeigt. Eine Disubstitution der Aminogruppen war häufig, wie die Signale 655 oder 893 beweisen. Das Signal mit  $m/z$  91 (mit einer Intensität von  $0,5 \times 10^7$ , nicht abgebildet) belegt, dass trotz der milden Bedingungen eine Fragmentierung auftritt.

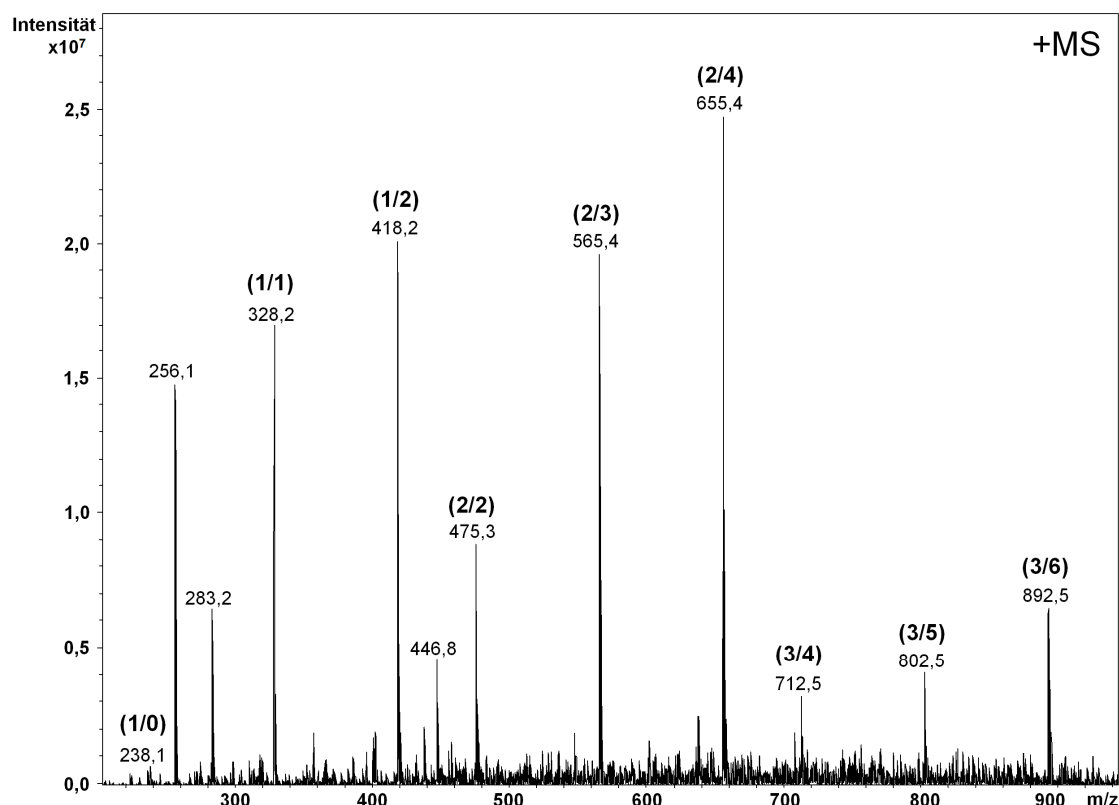


Abb. 6.4: ESI-MS von N-Benzylaminopropylidextran (Bn-3,  $DS_{BN} = 1,56$ ) nach Hydrolyse. In Klammern: Anzahl AP / Anzahl Bn.

In den reduktiven Aminierungsreaktionen mit Benzaldehyd (pH 4) wurde der Einfluss von steigenden Äquivalenten an Aldehyd untersucht (Bn-1 bis Bn-3, mit 1, 4 und 10 eq/ $NH_2$ -Gruppe, siehe Tabelle 6.1). Diese Erhöhung führte zu einer Steigerung der Kopplungsrate von 23 auf 103 % (bezogen auf AP). Der Substitutionsgrad stieg von 0,35 auf 1,56 bei einem Ausgangs- $DS_{AP}$ -Wert von 1,52 in allen Ansätzen. Im Fall von Bn-4 bis Bn-6 wurden unterschiedliche Dextrane mit variierenden  $DS_{AP}$ - und  $DS_{CE}$ -Werten unter den gleichen Bedingungen wie in Ansatz Bn-3 umgesetzt. Es resultierten Kopplungsraten von 91 - 105 %. Bei Bn-6 wurde ein Aminoderivat mit einem sehr großen Anteil an verbliebenen Cyanoethylgruppen eingesetzt ( $DS_{CE} = 2,40$ ,  $DS_{AP} = 0,28$ ). Der geringe Kopplungsgrad von 8 % ( $DS_{BN} = 0,02$ ) bei dieser Versuchsdurchführung ist vermutlich auf die schlechte Löslichkeit des verwendeten Derivats zurückzuführen. Zudem musste das  $^1H$ -NMR-Spektrum in  $DMSO-d_6$  aufgenommen werden, wodurch die Vergleichbarkeit mit den in  $MeOH-d_4$  gemessenen Spektren (Bn-1 bis Bn-5) nur eingeschränkt möglich war.

### 6.2.2 N-(4-Hydroxy-3-methoxy)benzyl-aminopropylidextran

Die Resultate der Kopplung von Vanillin (4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd) werden im Folgenden vorgestellt. In Abb. 6.5 ist der Vergleich der ATR-IR-Spektren der Proben Van-2, 13 und 14 einem Aminopropylidextran (APD-17) dargestellt. Neben der charakteris-



tischen O-H-Valenzschwingung des Polysaccharids ( $2990 - 3550 \text{ cm}^{-1}$ ) liegen die Valenzschwingungen der N-H-Gruppen im Bereich von  $2990 - 3550 \text{ cm}^{-1}$  vor. Im Fall einer Vanillinkopplung sind die aromatischen C-C-Schwingungen bei  $1519 \text{ cm}^{-1}$  und die aromatischen C-H-Deformationsschwingungen bei Wellenzahlen von 858, 817 und  $787 \text{ cm}^{-1}$  detektierbar.

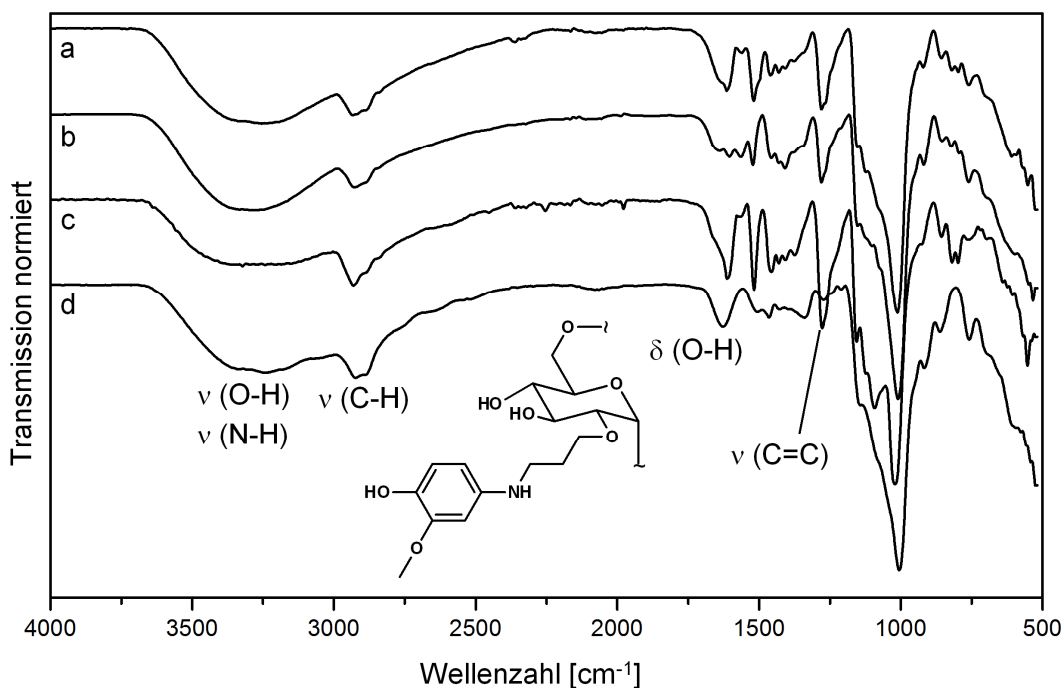


Abb. 6.5: ATR-IR-Spektrum von (a) Van-2 ( $DS_{Van} = 0,34$ , aus APD-17,  $DS_{AP} = 0,64$ ), (b) Van-13 ( $DS_{Van} = 0,48$ , aus APD-16,  $DS_{AP} = 0,47$ ), (c) Van-14 ( $DS_{Van} = 0,48$  aus APD-32,  $DS_{AP} = 0,63$  und  $DS_{CE} = 0,85$ ) und einem Aminopropyldextran APD-17 ( $DS_{AP} = 0,64$ ).

Bei einer erfolgreichen Kopplung von Vanillin durch reduktive Aminierung an Aminopropyldextrane sind im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum die Signale der drei aromatischen Protonen ( $H-12$ ,  $13$ ,  $16$ ) als breites nicht aufgelöstes Signal mit einer chemischen Verschiebung von 6,92 ppm erkennbar (Abb. 6.6). Durch die Reaktion der primären Aminogruppe erfolgt eine Verbreiterung der Signale der Methylengruppen des ehemaligen Aminopropylrestes im Vergleich zum Ausgangspolysaccharid. Ein Vergleich der beiden Spektren von Van-13 (a) (in  $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz, 240 Scans) mit (b) (in  $\text{MeOH-}d_4$ , 600 MHz, 128 Scans) macht deutlich, wie die unterschiedlichen Messbedingungen und Lösungsmittel die Qualität der Spektren beeinflussen.

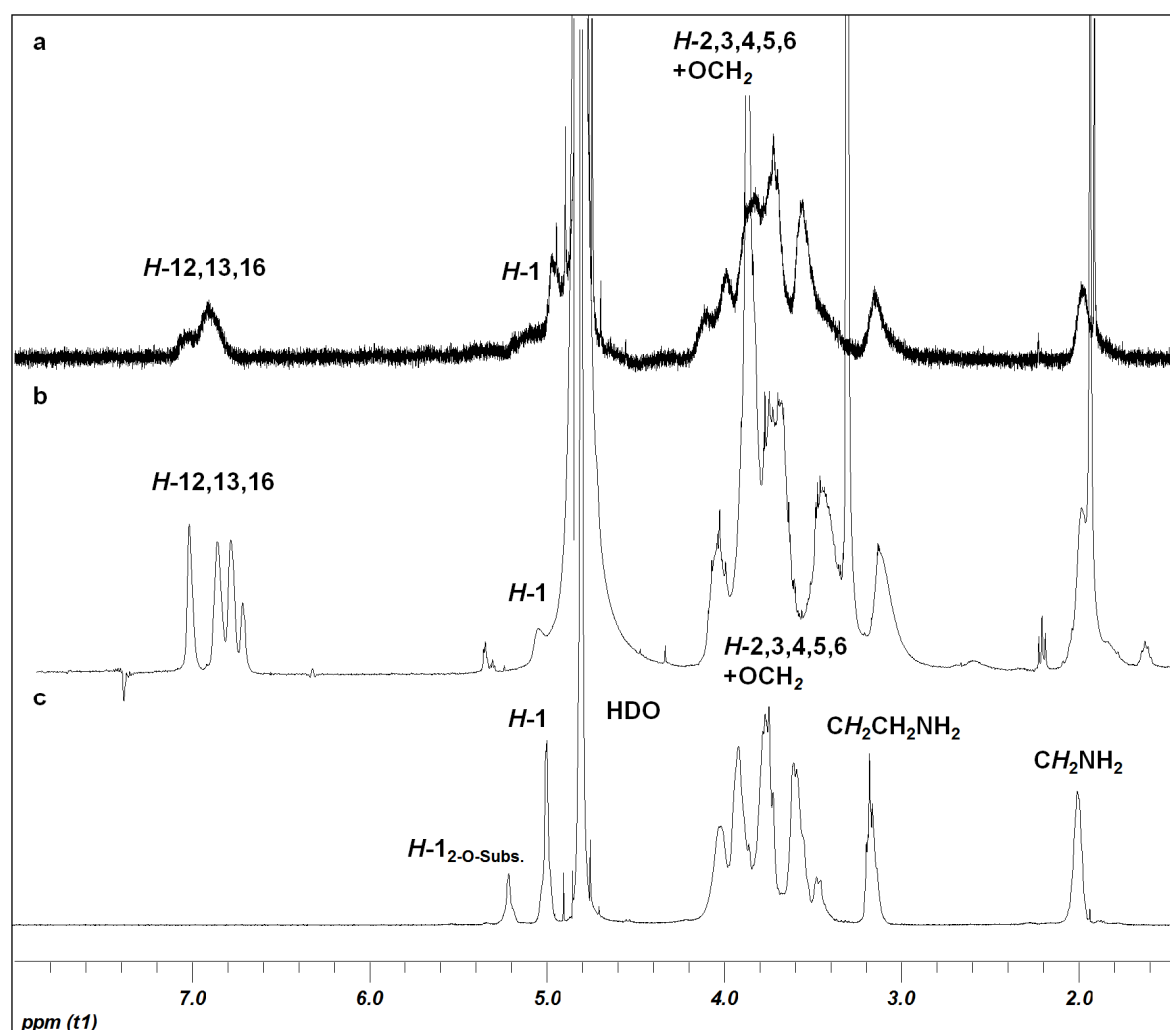


Abb. 6.6:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von (a) Van-13 in  $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz, (b) Van-13 in  $\text{MeOH-d}_4$ , 600 MHz, ( $\text{DS}_{\text{Van}} = 0,48$ ,  $\text{Van/AP} = 1,03$ ) im Vergleich zu APD-16  $\text{DS}_{\text{AP}} = 0,47$  in  $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz.

Die Berechnung des Substitutionsgrades ( $\text{DS}_{\text{Van}}$ ) erfolgt wie oben am Beispiel der Benzaldehydkopplung gezeigt (Abschnitt 6.2.1). Der Divisor des Integrals der aromatischen Protonen ( $\text{H}_{\text{arom}}$ ) ist im Fall von Vanillin 3. Es wird auf das Integral der Methylengruppe mit  $\delta = 3,12$  ppm bezogen, da dieses in den meisten Spektren besser isoliert ist (Gleichung (6.3)). Aus dem prozentualen Belegungsgrad (%Van) wird anschließend über den  $\text{DS}_{\text{AP}}$ -Wert des Eduktes der  $\text{DS}_{\text{Van}}$  berechnet (Gleichung (6.4)).

$$\text{Van} [\%] = \frac{1/3 \int \text{H}_{\text{arom}}}{1/2 \int \text{CH}_2} * 100 \quad (6.3)$$

$$\text{DS}_{\text{Van}} = \frac{\text{DS}_{\text{AP}}}{100} * \text{Van} [\%] \quad (6.4)$$

Im Fall der Probe Van-13 war es möglich 2-D NMR-Messungen und damit eine genauere Zuordnung durchzuführen.

Abbildung 6.7 zeigt ein HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation) Spektrum von Van-13 in  $\text{MeOH-}d_4$ , mit dem die direkten Verknüpfungen von Kohlenstoff und Wasserstoff analysiert werden können.

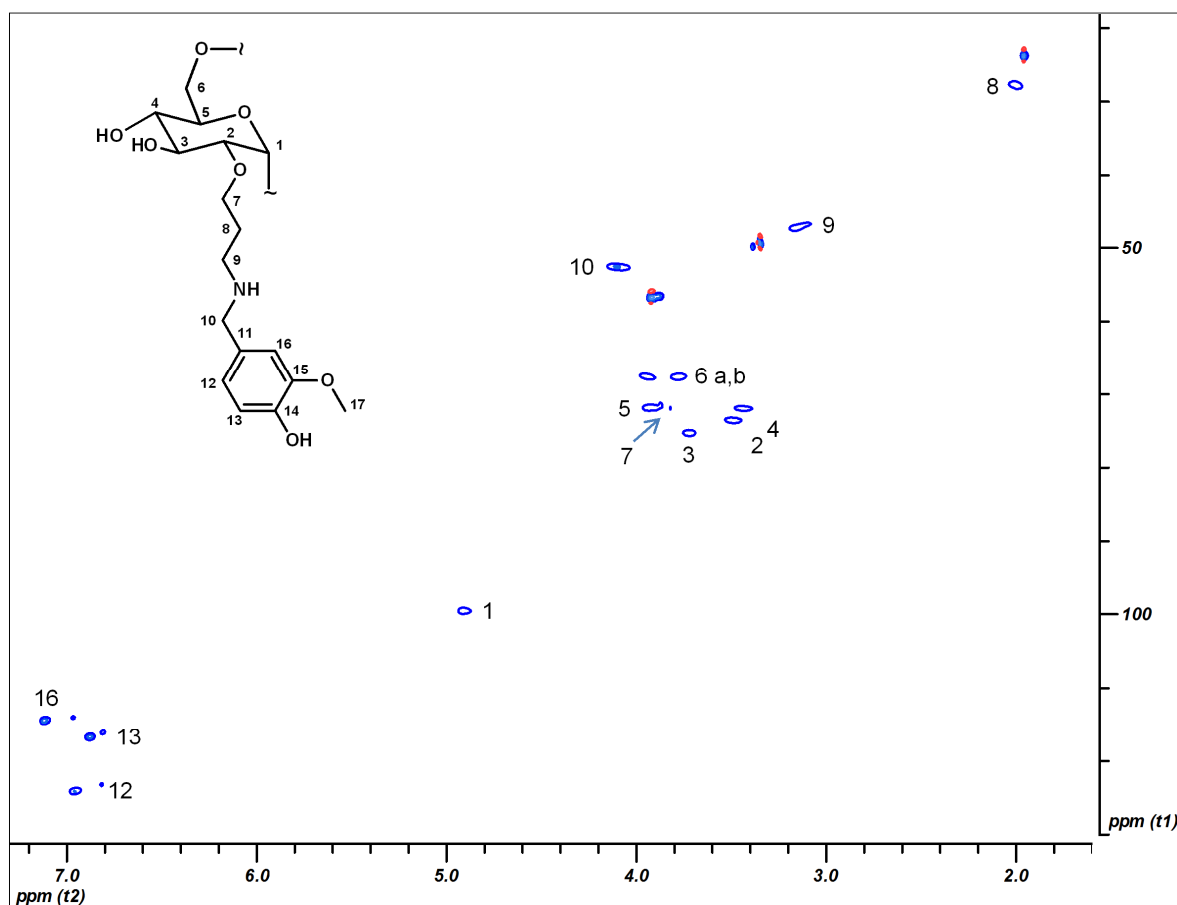


Abb. 6.7: HMQC-Spektrum von Van-13 ( $DS_{\text{Van}} = 0,48$ ) in  $\text{MeOH-}d_4$ .

Durch HMBC-Spektroskopie (Heteronuclear Multiple Bond Correlation;  $^2J(\text{H},\text{X})$  bis  $^4J(\text{H},\text{X})$ ) können Kopplungen über mehrere Bindungen analysiert werden. Im vorliegenden Fall kann durch Signal 10 der ehemaligen Aldehydfunktion, die jetzt als Methylengruppe zwischen Aminopropylrest und gekoppeltem Vanillin vorliegt, gezeigt werden, dass die Kopplung von Vanillin mit einem Aminopropyl-dextran erfolgreich war (Abb. 6.8).

Die Kreuzsignale (Cross peaks) von Proton  $H$ -10 mit den aromatischen Kohlenstoffatomen  $C$ -16 und  $C$ -12 sind gut erkennbar. Die weiteren kleinen Signale in dieser Region könnten von einer Disubstitution stammen. Eduktreste als Ursache für die Nebensignale konnten mittels DC-Kontrolle ausgeschlossen werden.

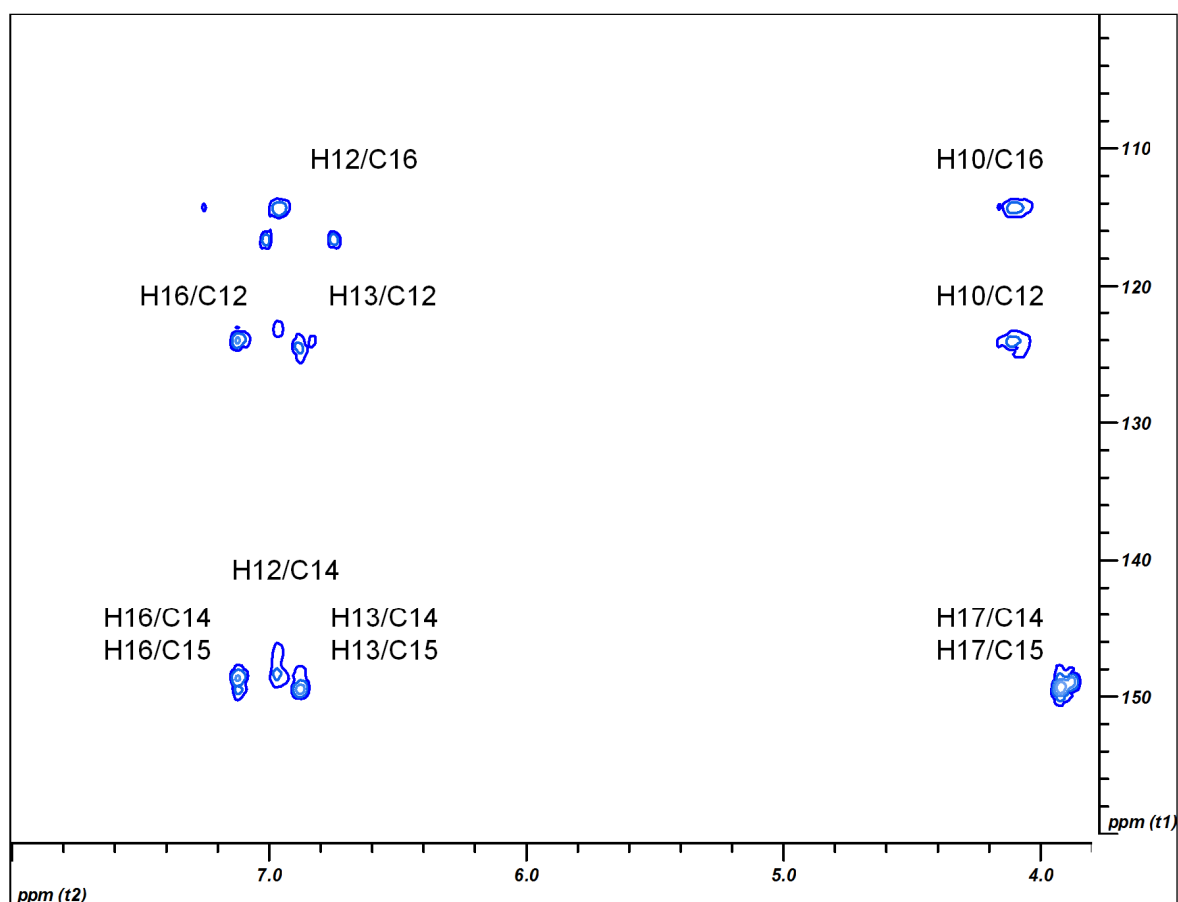


Abb. 6.8: HMBC-Spektrum ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  correlation) Van-13 ( $\text{DS}_{\text{Van}} = 0,48$ ), in  $\text{MeOH-d}_4$ .

Die Auswertung des ESI-MS-Spektrum des Hydrolysats von Van-13 zeigt, dass auch im Fall einer Vanillinkopplung z.T. zweifach substituierte Aminogruppen vorliegen. Die Inkremente betragen pro Aminopropylrest 57 und pro gekoppeltem Molekül Vanillin 136. Daneben sind Veresterungsprodukte mit Trifluoressigsäure ( $[\text{AP-VAN}+\text{TFA}+\text{H}]^+$ ) mit  $m/z$  von 334, 470 und 606 erkennbar (vergleiche Abb. 6.9). Unsubstituierte Glucosen sowie schlecht ionisierte Verbindungen  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  liegen ebenfalls vor. Mit  $m/z$  137 (Intensität  $1 \times 10^7$ , nicht abgebildet) zeigt sich, dass unter den milden Bedingungen eine Fragmentierung auftritt.

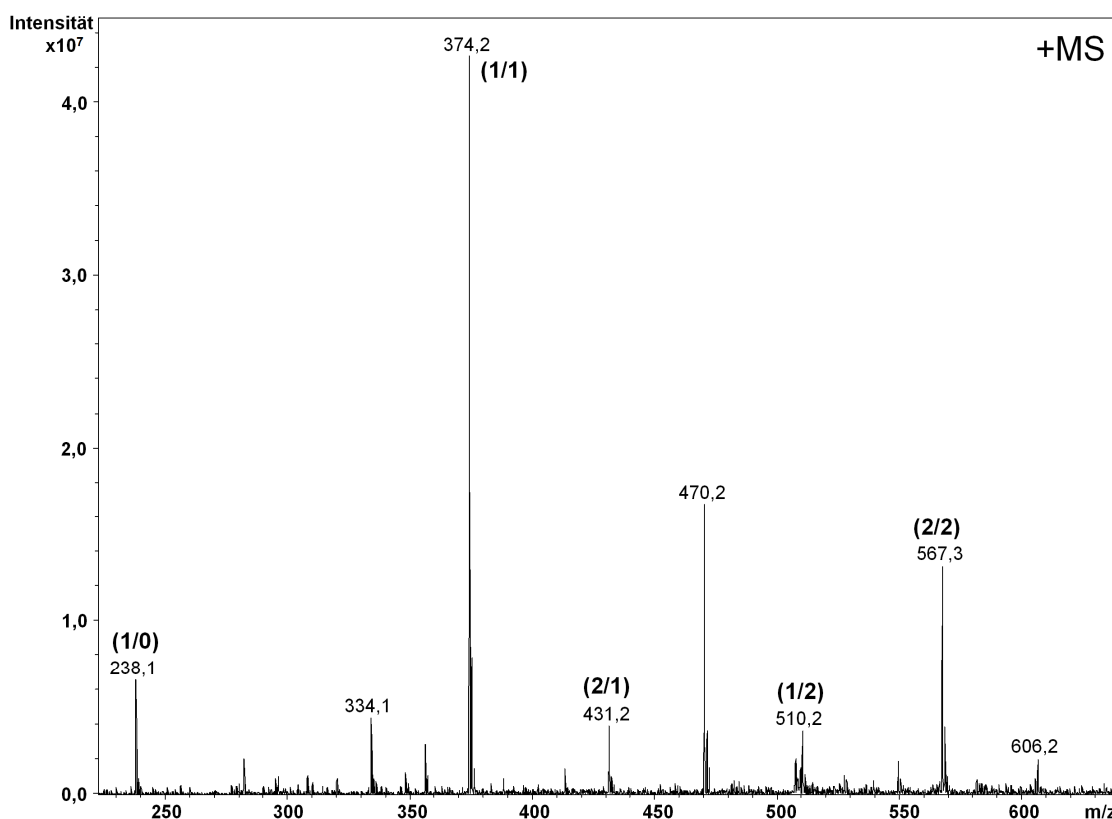


Abb. 6.9: ESI-MS von N-(4-Hydroxy-3-methoxy)benzyl-AP (Van-13,  $DS_{Van} = 0,48$ ), nach Hydrolyse. In Klammern: Anzahl AP / Anzahl Van.

In den Reaktionen mit Vanillin beeinflusste die Verdopplung der Äquivalente an Aldehyd bzw. die damit korrelierte Erhöhung der Picolinboranmenge von 4 auf 8 eq/ $NH_2$  in den Ansätzen Van-2 und Van-3 bei pH 4 (beide aus APD-17 mit  $DS_{AP} = 0,64$ ) die Kopplungsrate mit 53 % bzw. 58 % nur leicht (Van-2  $DS_{Van} = 0,34$  und Van-3  $DS_{Van} = 0,37$ ).

Wurden geringere Äquivalente an Aldehyd, wie in den Ansätzen Van-11 und 12 (1 und 0,8 eq/ $NH_2$  Vanillin), bei einem pH-Wert von 4, eingesetzt, so ergab sich eine Belegung von ca. 33 %. Die Ansätze Van-14 und Van-15 ( $DS_{AP} = 0,63$  bzw.  $DS_{AP} = 0,49$ ) wurden mit 10 bzw. 12 eq Aldehyd/ $NH_2$  umgesetzt und ergaben Produkte mit einem Belegungsgrad von 77 bzw. 92 % ( $DS_{Van} = 0,48$  bzw. 0,45). Auf der anderen Seite hatte die Variation des pH-Wertes einen großen Einfluss auf die Bindung von Vanillin. Bei einem pH-Wert von 4 wurde mit Van-13 ein Produkt mit einem Belegungsgrad von 103 % (aus APD-16,  $DS_{AP} = 0,47$ ) mit einem  $DS_{Van} = 0,48$  erhalten. Die Reaktion mit 2 eq Aldehyd/ $NH_2$  bei pH 8 (Van-7) resultierte in einem Belegungsgrad von nur 5 % ( $DS_{VAN} = 0,02$ ). Für die Kopplung von Vanillin an ein Aminopropyl-dextran ist damit ein saures Reaktionsmedium (pH 4) besser geeignet. In Ansatz Van-16 wurde ein Aminopropyl-dextran mit einem hohen Anteil an nicht reduzierten Cyanoethylgruppen (APD-31,  $DS_{AP} = 0,28$  und  $DS_{CE} = 2,31$ ) eingesetzt. Mit 6 eq Aldehyd wurde eine Belegung von 43 % ( $DS_{Van} = 0,12$ ) erreicht.

### 6.2.3 *N*-3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxy-benzl-aminopropyl-dextran

Bei 3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxy-benzaldehyd (BHT-CHO, in der gebundenen Form nach reduktiver Aminierung mit BHT abgekürzt) handelt es sich um die Aldehydform von Butylhydroxyltoluol, einem in Lebensmitteln, Nahrungsergänzungsmitteln, Farben, Kosmetika oder Arzneimitteln eingesetzten Antioxidans. Es handelt sich um einen Zusatzstoff (E 312) dessen Verwendung durch die Zusatzstoffzulassungsverordnung geregelt ist.<sup>[2]</sup> Bei einer kovalenten Bindung von 3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxy-benzaldehyd an ein Aminopropyl-dextran sind im IR Spektrum deutlich die O-H- und N-H-Valenzschwingungen im Bereich von  $3550\text{ cm}^{-1}$  bis  $3253\text{ cm}^{-1}$  zu erkennen. Nach den typischen C-H bzw.  $\text{CH}_2$ -Valenzschwingungen bei  $2954$ ,  $2906$  und  $2867\text{ cm}^{-1}$  sind bei dem Kopplungsprodukt mit BHT-CHO bei  $1667$  und  $1591\text{ cm}^{-1}$  die Deformationsschwingungen der  $\text{NH}_2$ - bzw. NH-Gruppen besonders ausgeprägt. Die aromatischen C-C-Banden sind im Bereich von  $1500$  bis  $1480\text{ cm}^{-1}$ , die Deformationsschwingungen im Bereich von  $900$  bis  $800\text{ cm}^{-1}$  sowie bei  $676\text{ cm}^{-1}$  zu erkennen (Abb. 6.10).

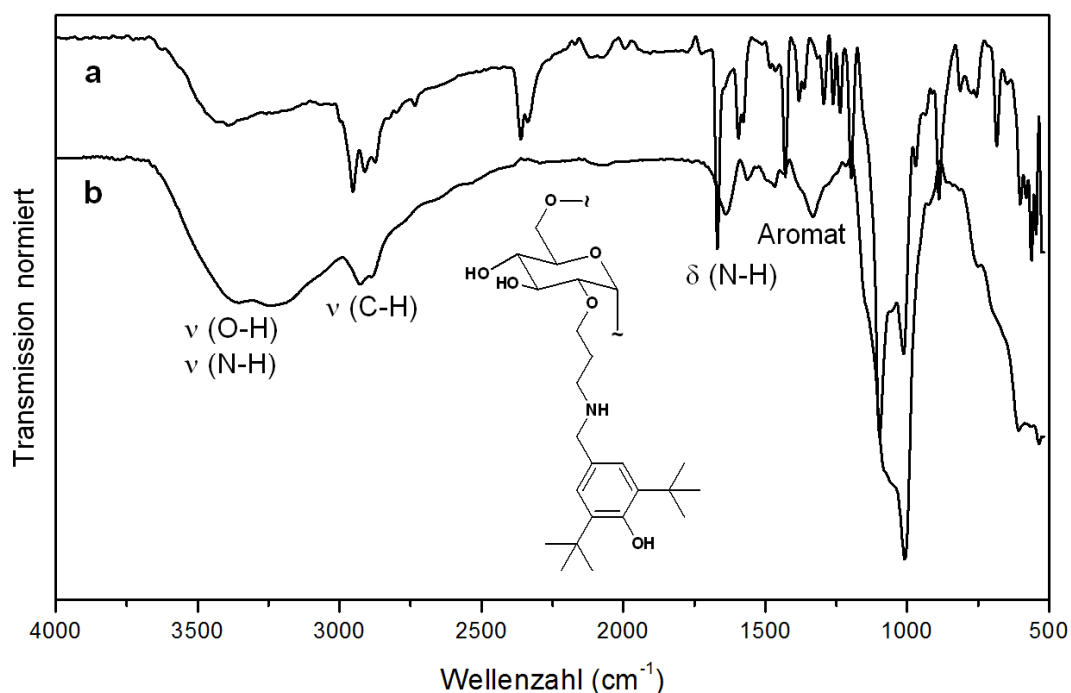


Abb. 6.10: ATR-IR-Spektrum von (a) BHT-5 ( $\text{DS}_{\text{BHT}} = 0,15$ ) im Vergleich mit (b) APD-14 ( $\text{DS}_{\text{AP}} = 1,57$ ). (Nicht unterdrückte  $\text{CO}_2$ -Schwingungen aus umgebender Luft bei  $2357$  und  $2334\text{ cm}^{-1}$ ).

In den  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der mit BHT-CHO gekoppelten Aminopropylglucane sind als signifikante Signale das der zwei aromatischen Protonen ( $7,18\text{ ppm}$ ) und die der  $\text{CH}_3$ -Gruppen des *tert*-Butylrestes ( $H_{-18}$ ,  $1,40\text{ ppm}$ ) des Antioxidans enthalten (siehe Abb. 6.11). Die Auflösung ist bei diesen Glucanderivaten relativ gut. Ursache können der geringe Substitutionsgrad von  $0,15$  bis  $0,70$  bei BHT-5 bzw. BHT-6 (vergleiche Tabelle 6.1) oder der Solvatationszustand im verwendeten Lösungsmittel ( $\text{D}_2\text{O}$ ) sein.

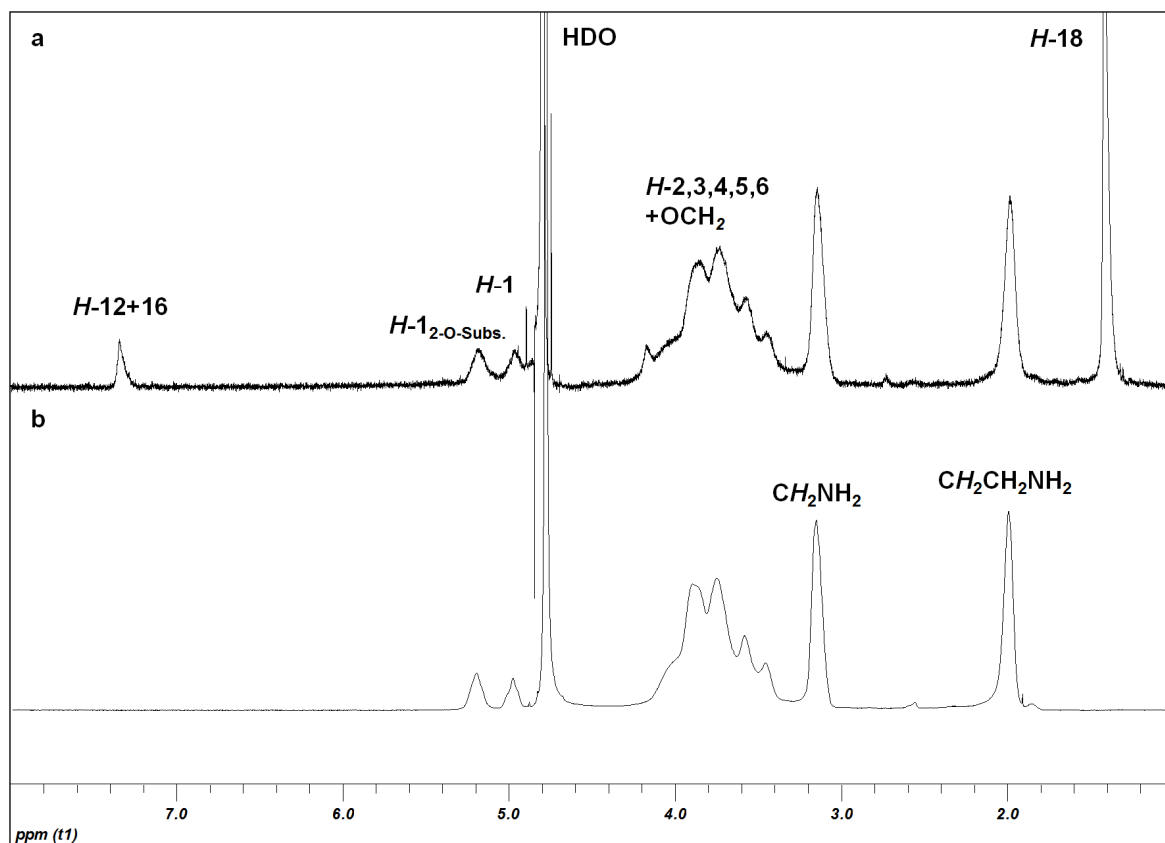


Abb. 6.11:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (400 MHz) in  $\text{D}_2\text{O}$  von (a) BHT-5 ( $\text{DS}_{\text{BHT}} = 0,15$ ) im Vergleich mit einem Aminopropyldextran (b) APD-27 ( $\text{DS}_{\text{AP}} = 1,31$ ).

Die Berechnung des mittleren Belegungsgrades (= molares BHT/AP-Verhältnis) und des  $\text{DS}_{\text{BHT}}$ -Wertes erfolgte analog zu den Berechnungen bei der Vanillinkopplung mit den Gleichungen (6.5) und (6.6). Da es sich bei dem eingesetzten Antioxidans um einen tetrasubstituierten Aromaten handelt, repräsentiert das Integral der aromatischen Protonen in diesem Fall 2 und entspricht damit der Anzahl der Protonen in der Methylengruppe, sodass die Integrale direkt miteinander ins Verhältnis gesetzt werden können.

$$\text{BHT} [\%] = \frac{\int H_{\text{arom}}}{\int \text{CH}_2} * 100 \quad (6.5)$$

$$\text{DS}_{\text{BHT}} = \frac{\text{DS}_{\text{AP}}}{100} * \text{BHT} [\%] \quad (6.6)$$

Im ESI-MS-Spektrum des Hydrolysats (Abb. 6.12) ist mit  $m/z$  465 eine Glucosyleinheit mit Aminopropylrest und gekoppelten BHT zu erkennen. Auch eine Disubstitution bzw. zwei Aminopropylreste mit je einem Molekül BHT werden mit einem  $m/z$  von 731,5 detektiert. Angezeigt werden  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Neben dem Signal 295 für zwei gekoppelte Aminopropylreste liegt ein Fremdpeak bei 294 vor. Mit dem  $m/z$  219 wird deutlich, dass unter den milden Bedingungen eine teilweise Fragmentierung auftritt.

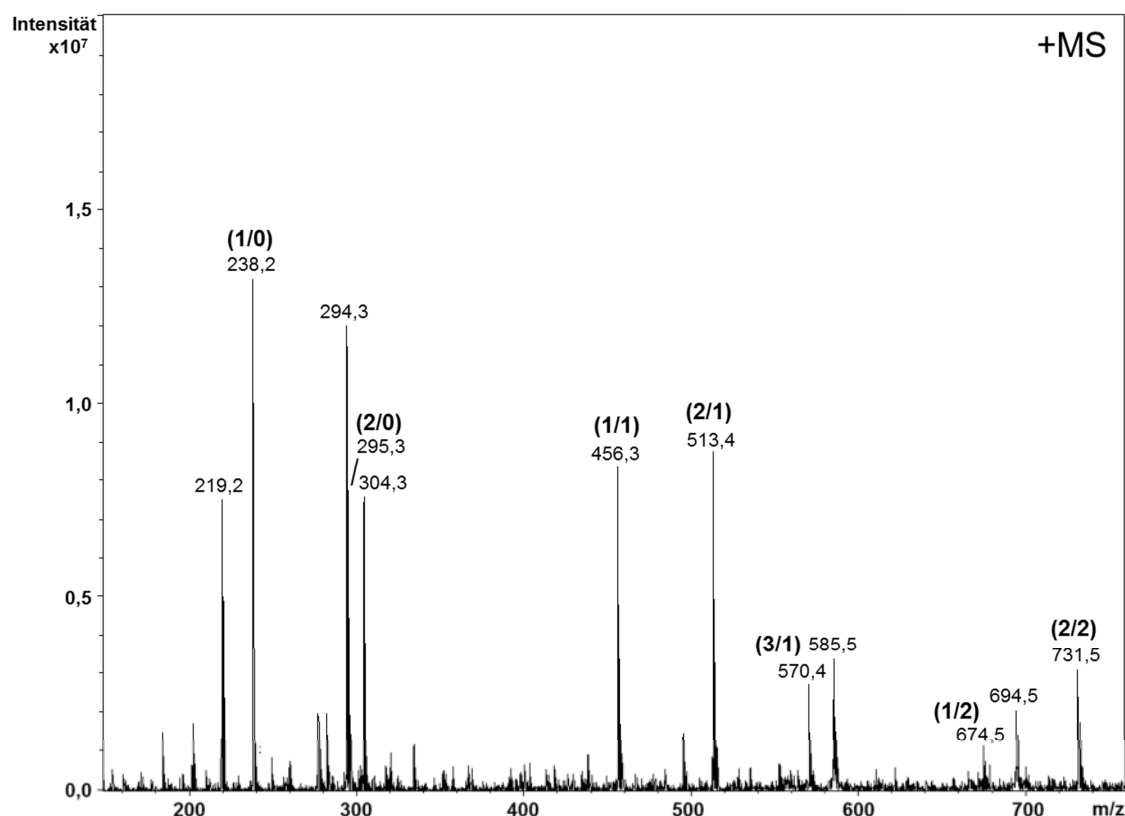


Abb. 6.12: ESI-MS von 3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxy-benzyl-aminopropyl-dextran (BHT-5) nach Hydrolyse. In Klammern: Anzahl AP / Anzahl BHT.

Im Fall der Kopplung mit BHT mit APD-34 ( $DS_{AP} = 1,31$ ) bei einem pH-Wert von 4 führte der Einsatz des Aldehyds im Überschuss (BHT-5, 10 eq/ $NH_2$ -Gruppe) zur einer Belegung von nur 12 % ( $DS_{BHT} = 0,15$ ). Der Vergleich mit BHT-6 mit nur 2 eq Aldehyd/ $NH_2$  zeigte, dass verlängerte Reaktionszeiten (29 h insgesamt) zu einem starken Anstieg der Bindung von BHT führen. Die erzielte Belegung betrug hier 53 % ( $DS_{BHT} = 0,70$ ).

#### 6.2.4 Maltose und Maltotriose

Maltose ( $G_2$ ) ist ein Disaccharid (4- $O$ - $\alpha$ -D-Glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Glucopyranose) und wird aus dem Abbau von Stärke gewonnen.<sup>[2]</sup> Maltotriose ( $G_3$ ) ist das nächst höhere Homologe und bildet die Trisaccharid-Grundeinheit des Pullulanmoleküls (vergleiche Abb. 1.1). Werden diese Saccharide über ihr reduzierendes Ende durch reduktive Aminierung an Aminopropylglucane gebunden, sind im Vergleich zum Ausgangsaminopropyl-dextran keine großen Unterschiede sichtbar, da das eingeführte Molekül im Wesentlichen die gleichen Funktionalitäten wie das Edukt aufweist. Im Bereich der  $NH$ - und  $NH_2$ -Deformationsschwingungen (1650 bis 1550  $cm^{-1}$ ) sind durch die Umwandlung zum sekundären (ggf. tertiären) Amin geringe Abweichungen detektierbar (Abb. 6.13). In der Literatur wurde bei der Kopplung von Formylmethyl-mannopyranosid mit einem aminofunktionalisierten Dextran über reduktive Aminierung eine Abnahme der In-plane-Schwingung von



NH<sub>2</sub> bei 1596 cm<sup>-1</sup> beschrieben.<sup>[145]</sup> In den unten gezeigten Spektren ist die Bande der N-H-Schwingung bei 1626 cm<sup>-1</sup> nach Kopplung von Maltose verringert.

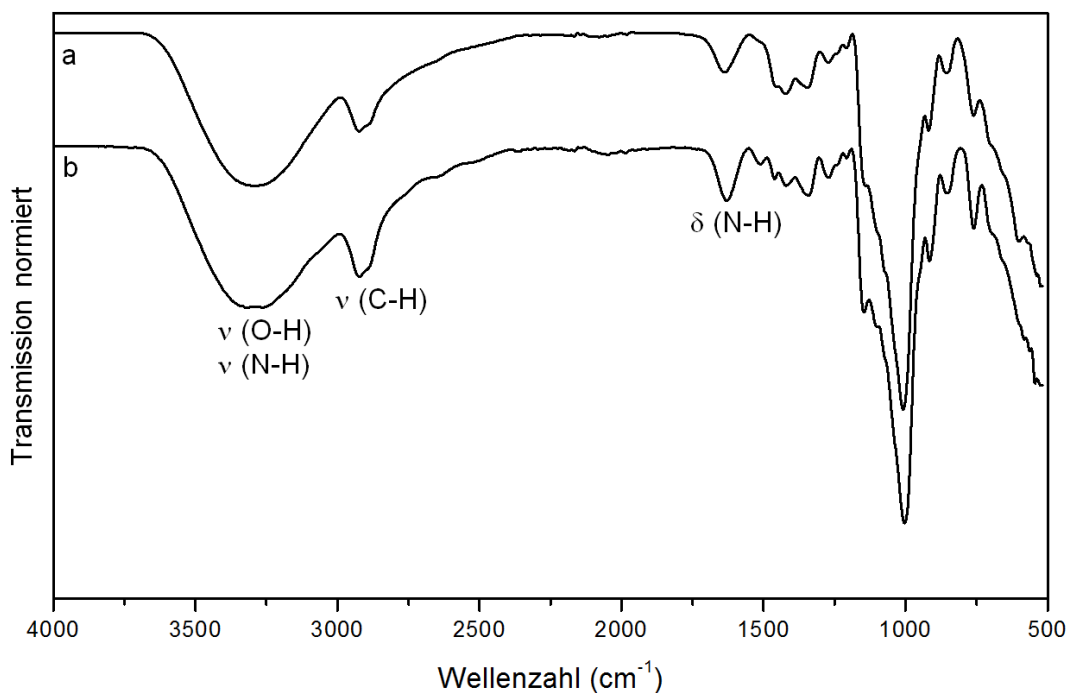


Abb. 6.13: ATR-IR-Spektrum von (a) G<sub>2</sub>-3 (DS<sub>G2</sub> = 0,36) im Vergleich mit der entsprechenden Aminopropyl-dextran-Vorstufe APD-19 (DS<sub>AP</sub> = 0,46).

Mittels NMR-Spektroskopie kann die kovalente Bindung von Maltose bzw. Maltotriose an Aminopropyl-dextrane bewiesen werden (Abb. 6.14). Im Fall der erfolgreichen Kopplung mittels reduktiver Aminierung entsteht durch Ringöffnung ein neues Signal für das H-1 α- (1,4) des Maltitolrestes.

Durch die Bindung von Maltotriose entstehen zwei neue Signale (5,39 ppm und 5,11) im Verhältnis 1 : 1. Die Signalzuordnung der <sup>13</sup>C- und <sup>1</sup>H-NMR-Spektren erfolgte anhand der Arbeiten von Hoffmann und Davies.<sup>[146]</sup> Im Vergleich zum Ausgangs-Aminopropyl-dextran wird durch die kovalente Bindung von Maltose (Abb. 6.14, b) eine feinere Signalauftrennung erhalten. Dieser Effekt wird bei der Kopplung von Maltotriosen noch gesteigert (vergleiche Abb. 6.14, a und b) und könnte auf die steigende Beweglichkeit bei zunehmender Länge des Substituenten zurückgeführt werden.

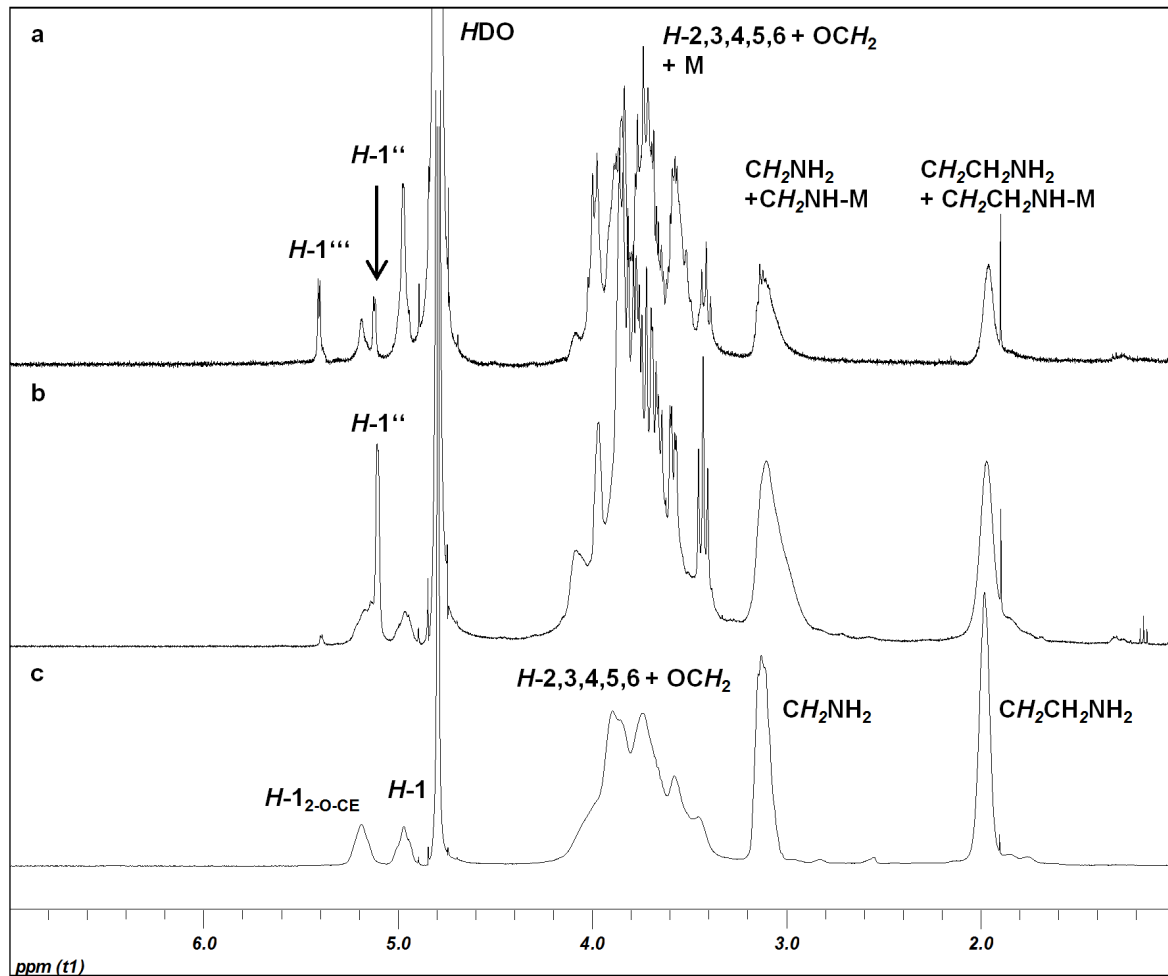


Abb. 6.14:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (400 MHz) in  $\text{D}_2\text{O}$  von (a)  $\text{G}_3$  ( $\text{DS}_{\text{G}_3} = 0,17$ ), (b)  $\text{G}_{2-8}$  ( $\text{DS}_{\text{G}_{2-8}} = 0,90$ ) und (c) APD-23 ( $\text{DS}_{\text{G}_3} = 1,52$ , Vorstufe von  $\text{G}_{2-8}$ ), Mit M für gekoppelte Maltose bzw. Maltotriose.

Zur Berechnung des DS-Wertes wurde das Integral bei 5,11 ppm herangezogen. Zunächst wird, wie bei Van und BHT wieder der mittlere Belegungsgrad (molares Maltose/AP bzw. Maltotriose/AP-Verhältnis) und anschließend der Substitutionsgrad  $\text{DS}_{\text{G}_2}$  bzw.  $\text{DS}_{\text{G}_3}$  mit den Gleichungen (6.7) und (6.8) berechnet.

$$G_2 [\%] = \frac{\int H_{\alpha(1-4)}}{1/2 \int \text{CH}_2} * 100 \quad (6.7)$$

$$\text{DS}_{\text{G}_2} = \frac{\text{DS}_{\text{AP}}}{100} * G_2 [\%] \quad (6.8)$$

Nach erfolgreicher Bindung von Maltose an Aminopropylglucane (*N*-1-Desoxy-maltitol) konnten nach Methanolyse Methylglucoside mit Aminopropylresten und einer Desoxyglucoseeinheit als  $m/z$  416  $[\text{M}+\text{H}^+]$  detektiert werden. In Abb. 6.15 ist zusätzlich eine Methylglucose mit einem Aminopropylrest 252  $[\text{M}+\text{H}^+]$  zu erkennen.

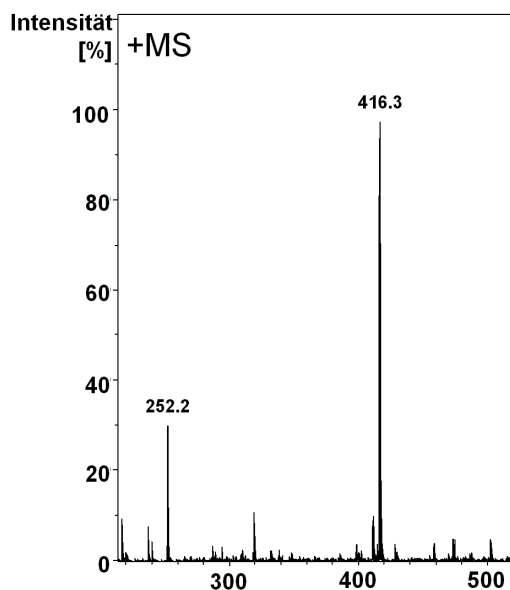


Abb. 6.15: ESI-MS von  $G_{2-8}$  ( $DS_{G_{2-8}} = 0,90$ ) nach Methanolyse. In Klammern: Anzahl AP / Anzahl  $G_2$ .

In den Ansätzen  $G_{2-1}$  -  $G_{2-3}$ , mit APD-19 ( $DS_{AP} = 0,46$ ) als Glucan, sollte zunächst der Einfluss von verschiedenen pH-Werten (3, 7 und 9) untersucht werden. Im neutralen oder sauren Reaktionsmilieu wurde nur ein marginaler Umsatz erzielt ( $DS_{G_2} = 0,08$  bzw.  $0,07$ ). Eine große Steigerung auf 78 % wurde bei pH 9 erreicht ( $G_{2-3}$ ,  $DS_{G_2} = 0,36$ ). Alle folgenden Reaktionen in denen Oligosaccharide als Aldehyde fungierten ( $G_{2-4}$  bis  $G_{3-1}$  Tabelle 6.1) wurden unter diesen leicht alkalischen Bedingungen durchgeführt.

In den Arbeiten zur Synthese von zuckerhaltigen Polyornithin-Dendrimern von Baigude et al. wurden bei der Kopplung von Maltose und Lactose mittels reduktiver Aminierung ebenfalls alkalische Bedingungen (Borat-Puffer, 0,1 M, pH 9) gewählt. Die Aldehyde wurden im 16-fachen molaren Überschuss zur Dendrimervorstufe (TFA-Salze) und im Verhältnis 1:1,6 zum Reduktionsmittel ( $BH_3$ \*Pyridin-Komplex) zugesetzt. Im Vergleich zu den in dieser Arbeit durchgeführten Reaktionen war die Reaktionszeit mit 7 Tagen deutlich länger. Die Reaktionstemperatur war mit 50 °C ähnlich. Eine mögliche Anwendung der von Baigude und Mitarbeiter synthetisierten zuckerhaltigen Polyornithin-Dendrimere ist die Antigenbereitstellung. Durch die Funktionalisierung mit Zuckern werden reichlich OH-Gruppen eingeführt, die dann genutzt werden können um Peptidantigene über milde Veresterungen anzulagern. Darüber hinaus konnten durch Variation der Anzahl der Zuckermoleküle und die Art der Zucker die Immunantwortprozesse beeinflusst werden. In den genannten Arbeiten wurde gezeigt, dass die Anzahl der gekoppelten Oligosaccharide durch die Reaktionsbedingungen gesteuert werden kann und dass ein Modellpeptid mit einer reaktiven Carboxylfunktion an die Hydroxylgruppe in Position 6 eines gebunden Zuckermoleküls gekoppelt werden kann. Wird das molare Verhältnis von

Maltose zur Aminogruppe im Bereich von 2 : 1 bis 20 : 1 gesteigert, erfolgt eine Erhöhung von 9 auf 15 gekoppelter Maltosemoleküle an einem Dendrimer mit 8 Aminogruppen (Kopplungstellen).<sup>[147]</sup>

Aufbauend auf diesem Arbeiten entwickelten Appelhans et al. die Modifizierung von Polypropylenimine-Dendrimeren oder von Polyethyleniminen mit Oligosacchariden über reduktive Aminierung.<sup>[59,148,149]</sup>

Zur Synthese von Oligosaccharid-modifizierten Polypropylenimine-Dendrimeren wurden die bei Baigude beschriebenen Reaktionsbedingungen angewandt. Große molare Überschüsse an Oligomeren (Maltose und Maltotriose) und an Reduktionsmittel von der 60- bis 158-fachen bzw. 84 bis 154-fachen Menge gegenüber den Dendrimervorstufen wurden eingesetzt. Damit wurde für die Maltose-Kopplung an zwei eingesetzten Polypropylenimine-Dendrimeren ein DS von durchschnittlich 7,7 von 8 Besetzungsmöglichkeiten bzw. 15 von 16 Möglichkeiten erreicht. Im Fall von Maltotriose lagen die DS-Werte bei 7,7 (von 8) bzw. 15,4 (von 16). Die Kopplung der Aldehyde war damit höher, als in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen. Die Polypropylenimine-Dendrimere können als Transporter von  $\text{Cu}^{2+}$  für therapeutische und diagnostische Zwecke eingesetzt werden. Die Funktionalisierung mit Maltose und Maltotriose beeinflusst die Komplexierung von Metallionen in Polypropylenimin-Dendrimeren nicht. Durch die in der Peripherie des Dendrimers gebundenen Zucker kann der Dekomplexierungsprozess bei Applikationen in biologischen Matrices zudem verhindert werden.<sup>[148]</sup>

Die gleichen Reaktionsbedingungen wurden für die Funktionalisierung von Polyethyleniminen mit Maltose, Maltotriose und Maltoheptaose eingesetzt. Polyethylenimine sind die effektivsten kationischen Polymere zur Genübertragung. Durch nicht-kovalente Wechselwirkungen können sie z.B. DNA komplexieren. Durch die Kopplung von Oligosacchariden wird eine bessere Akzeptanz der Dendrimere in biologischen Systemen erreicht und sie werden vor Abbauprozessen geschützt. Der Einfluss von unterschiedlich langen Zuckerketten auf die Komplexierung von DNA wurde untersucht. Die pH-abhängigen Ladungsdichten der Dendrimere sind mit der Struktur, dem Belegungsgrad und der Länge der gekoppelten Zucker korreliert. Je größer die resultierenden Dendrimere, desto kleiner ist die Ladungsdichte. Grad und Muster der Substitution führen damit zu veränderten RNA-Bioverteilungsprofilen *in vivo*. Es wurde beschrieben wie durch Variation der Eduktmengen unterschiedliche Funktionalitätsdichten und damit Strukturen Saccharid-beschichteter Polyethylenimine realisiert werden können. Die reduktive Aminierung wurde wieder entsprechend den Arbeiten von Baigude durchgeführt, wobei die molekularen Äquivalente von Glucose, Maltose, Lactose, Maltotriose und Maltoheptaose zum Reduktionsmittel 1:1 betrugen. Bei der Untersuchung mit PEI wurden Verhältnisse von 1 : 5 bis 1 : 10 (PEI : reduzierender Zucker) getestet und die Ausbeute betrug 49 bis 98 %

mit einem Funktionalisierungsgrad von 77 bis 95 %. Für die Kopplung von Maltose wurden 0,2 bis 10 eq/PEI eingesetzt. Mit 0,2 bis 0,5 eq wurden bereits Funktionalisierungsgrade von 16 bzw. 36 % erreicht. Wurde das Verhältnis 1 : 2 (PEI : Maltose) eingesetzt, resultierten 86 %. Weitere Steigerungen führten zu einer geringeren Erhöhung der Kopplung und bei einem Verhältnis von 1 : 10 betrug der Funktionalisierungsgrad 91 %. Bei der Umsetzung von PEI mit Maltoheptaose wurden etwas geringere Umsätze erreicht. Das Verhältnis 1:5 führte beispielsweise zu 77 % Funktionalisierung.<sup>[149]</sup> Der Einsatz dieser Maltose- bzw. Maltotriose-modifizierten Polyethylenimin-Dendrimere (PEI) als Komplexierungsmittel für DNA bzw. RNA wurde untersucht. Durch die Funktionalisierung mit Zuckermolekülen konnten die toxikologischen Eigenschaften von reinen Polyethylenimininen gesenkt werden.<sup>[59]</sup> In den oben diskutierten Arbeiten wird ein Natriumboratpuffer als Reaktionsmedium eingesetzt. Durch Möglichkeit der Komplexierung der Diolgruppen mit Borat wird das Gleichgewicht zusätzlich auf die Seite der offenkettigen Form des Zuckers verschoben.

Ein weiteres Beispiel für die Funktionalisierung von Polysacchariden mit Kohlenhydraten ist die kovalente Bindung eines Mannosederivats an Chitosan. Hierfür wurde eine modifizierte Mannose (Formylmethyl-mannopyranosid) mit dem Polysaccharid in 5%iger wässriger Essigsäure (pH 2,2 bis 2,5) mit  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  umgesetzt. Auch hier wurde das Reduktionsmittel im Überschuss verwendet. Der saure pH-Wert erklärt sich durch die Verwendung eines Mannosederivats, welches hier über die eingeführte Aldehydfunktion und nicht wie in den Versuchen dieser Arbeit über die offenkettige Form des reduzierenden Zuckers gebunden wurde. Durch Variation des Aldehyd-zu-Chitosan-Verhältnisses wurde eine Belegung von bis zu 60,9 % erreicht. Das molare Verhältnis von Reduktionsmittel zu Chitosan blieb immer 4 : 1. Unmodifiziertes Chitosan zeigt geringe Zellspezifität und geringe Transfektionseffizienz. Durch die Kopplung von einer mit Aldehydgruppe modifizierten Mannose kann das Polymer aber mit Mannose-Rezeptoren für Endozytose- und Phagozytoseprozesse wechselwirken. Die zelluläre Aufnahme wird dadurch erhöht. In Tests mit Zelllinien wurde gezeigt, dass mit steigender Modifizierung des Chitins mit dem Mannosederivat die Zelllebensfähigkeit steigt.<sup>[145]</sup>

Die vorgestellten Anwendungsbeispiele weisen auf das Potential der in dieser Arbeit mit Sacchariden modifizierten Aminopropyldextrane hin.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Zusatz des Reduktionsmittels in mehreren Schritten erfolgen und der pH-Wert des Reaktionsmediums entsprechend dem  $\text{pK}_a$ -Wert der eingesetzten Aldehyde gewählt werden sollte (bei gleichbleibendem Substrat). Sollen Oligomere, wie Maltose oder Maltotriose über die Aldehydfunktion des reduzierenden Endes mittels reduktiver Aminierung an Aminopropyldextrane gekoppelt werden, so sind andere Reaktionsbedingungen als bei Umsetzung mit aromatischen

Aldehyden notwendig. Normalerweise wird der pH-Wert des Reaktionsmediums nach dem  $pK_a$ -Wert des eingesetzten Amins gewählt. In den vorliegenden Reaktionen war die Aminokomponente stets ein Aminopropyl-dextran und damit hätte es ein pH-Optimum für alle Aldehyde geben müssen. Festgestellt wurde, dass es unterschiedliche Optima für die einzelnen Aldehyde (aromatische Aldehyde und Oligosaccharide) gibt. Somit muss das pH-Optimum auch mit der Carbonylkomponente korreliert sein. Durch einen sauren pH-Wert wird die Carbonylfunktion der aromatischen Aldehyde aktiviert und damit der Reaktionsumsatz gesteigert. Im Fall von Oligosacchariden, wie Maltose oder Maltotriose, ist die Öffnung des Zuckerrings (zum Halbacetal) im basischen Milieu begünstigt und die reduktive Aminierung ergibt bei einem pH-Wert von 9 die besten Ergebnisse.

Die Verlängerung der Reaktionszeit trägt entscheidend zur Steigerung des Umsatzes der Aldehydkopplung bei und könnte noch weiter erhöht werden. Eine Erhöhung der Aldehydäquivalente trägt vor allem zur *N*-Disubstitution bei.

## 7 Nanostrukturierung

Nach der Definition des Begriffs „nano“ und Thematisierung der rechtlichen Grundlagen über die Verwendung von Nanomaterialien in Kapitel 1.4 werden im Folgenden Synthese und Analytik von Nanopartikeln in Hinblick auf die in dieser Arbeit verwendeten Materialien und Methoden vorgestellt. Zunächst werden Eisenoxid-Nanopartikel mit ihren magnetischen Eigenschaften beschrieben. Anschließend werden Funktionalisierung und Coating dieser Partikel insbesondere die Beschichtung mit modifizierten Glucanen diskutiert.

### 7.1 Eisenoxid-Nanopartikel

In diesem Abschnitt werden zunächst die einzelnen Eisenoxide vorgestellt. Liegen diese Verbindungen in einer Größenordnung im Nanometerbereich vor, zeigen sie besondere physikochemische Eigenschaften.

#### 7.1.1 Physikalische und chemische Eigenschaften

Mit einem Vorkommen von 6,2 % in der Erdkruste ist Eisen, nach Aluminium, das zweithäufigste Metall. Eisen liegt zumeist als Oxid in den Oxidationszahlen +2 und +3 vor. Brauneisenstein ist das häufigste Eisenoxid und berühmte Lagerstätten befinden sich u.a. in Peine und Salzgitter.<sup>[150]</sup>

##### **Magnetit, $\text{Fe}_3\text{O}_4$**

Das Eisen(II,III)-oxid  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , Magnetit, kristallisiert in der inversen Spinellstruktur  $\text{Fe}^{3+}(\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+})\text{O}_4$ . Das schwarze Mineral ist ferrimagnetisch und besitzt eine gute elektrische Leitfähigkeit, da aufgrund der Kristallstruktur ein schneller Elektronenaustausch zwischen den  $\text{Fe}^{2+}$ - und  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen der Oktaederlücken erfolgen kann. In den Tetraederlücken befinden sich ausschließlich dreiwertige Ionen. Magnetit oxidiert zu Maghemit und Hämatit.<sup>[150-152]</sup>

##### **Maghemit, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$**

Das braun-schwarze Maghemit ist ebenfalls ferrimagnetisch und ähnelt der Struktur des Magnetits (Isostruktur), es befinden sich aber nur dreiwertige Eisenionen in den Gitterlücken der Defektspinellstruktur. Es sind nur  $13\frac{1}{2}$  von den 16 möglichen Oktaederlücken besetzt und so wird die Elementarzelle unter Ausbildung einer tetragonalen Zelle auf drei

benachbarte Elementarzellen ausgedehnt. Die Teilgitter sind oktaedrisch koordiniert. Der Grund für Ferrimagnetismus sind entgegengesetzt ausgerichtete Spinmomente in den Untergittern. Maghemit ist stabiler und eignet sich besser für biologische Anwendungen.<sup>[97]</sup> Magnetit und Maghemit haben aufgrund ihrer unterschiedlichen Elektronenkonfiguration auch unterschiedliche magnetische Momente.<sup>[151,152]</sup>

### **Hämatit, $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$**

Diese Form des Eisen(III)oxids wird auch Hämatit (Bluteisenstein) genannt und kristallisiert im Korund-Typ mit antiferrimagnetischen Eigenschaften. Es entsteht beim Erhitzen über 300 °C aus  $\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$ .<sup>[150,152]</sup>

### **Magnetische Eigenschaften von Eisenoxiden**

Im Folgenden werden die bereits oben erwähnten magnetischen Eigenschaften der Eisenoxide weiter ausgeführt. Hierbei ist zu beachten, dass sich das Magnetisierungsverhalten mit der Größe der Teilchen ändert. Das Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis wird umso größer, je kleiner die Partikel werden und Finite-Size-Effekte (Quantenbeschränkungen der Elektronen bzw. Oberflächeneffekte) beeinflussen die resultierenden Eigenschaften von Nanopartikeln. Ferromagnetismus beschreibt die Eigenschaft bestimmter Materialien ihre Elementarmagnete parallel zueinander auszurichten. Nickel, Cobalt und Eisen sind bei Raumtemperatur ferromagnetisch. Ferrimagnetismus ist eine Form des Ferromagnetismus mit schwächeren resultierenden magnetischen Momenten. Bei ferrimagnetischen Materialien, wie Magnetit und Maghemit sind die magnetischen Momente innerhalb der magnetischen Domänen (Weißschen Bezirke, Mehrdomänenpartikel) abwechselnd parallel und antiparallel ausgerichtet, wobei eine der beiden Richtungen ein stärkeres Moment hat als die andere. Eine makroskopische Magnetisierung resultiert.

Bei antiferromagnetischen Materialien sind die Ausrichtungen der magnetischen Momente ausgeglichen und das resultierende magnetische Moment ist, wie beim Hämatit, gleich Null. Mit Superparamagnetismus werden die magnetischen Eigenschaften von sehr kleinen Teilchen eines ferromagnetischen Materials beschrieben. Partikel, die als superparamagnetisch bezeichnet werden, weisen ohne äußeres Feld eine Magnetisierung von Null auf. Wird ein äußeres Feld angelegt, richten sich die magnetischen Momente daran aus. Diese Form des Paramagnetismus wird als intrinsisch bezeichnet, da die Magnetisierung durch thermische Fluktuation des magnetischen Moments im Kernvolumen geändert wird. Superparamagnetismus tritt auf, wenn der Durchmesser der kristallinen Bereiche unterhalb eines kritischen Wertes liegt. Hier liegen die Partikel im energetisch günstigeren Eindomänenzustand vor (Kerndurchmesser  $d_0$ ).



In Abb. 7.1 ist die Abhängigkeit der magnetischen Eigenschaften anhand der Koerzitivfeldstärke  $H_c$  von der Partikelgröße dargestellt. Dies ist die Feldstärke, die für eine Entmagnetisierung des Materials benötigt wird.<sup>[153]</sup> Bei Magnetitpartikeln beträgt die Grenze 30 nm (Durchmesser) beim Übergang zum Superparamagnetismus. Die Grenze zum Übergang zum Mehrdomänenpartikel liegt bei 80 nm.<sup>[152,154-156]</sup>

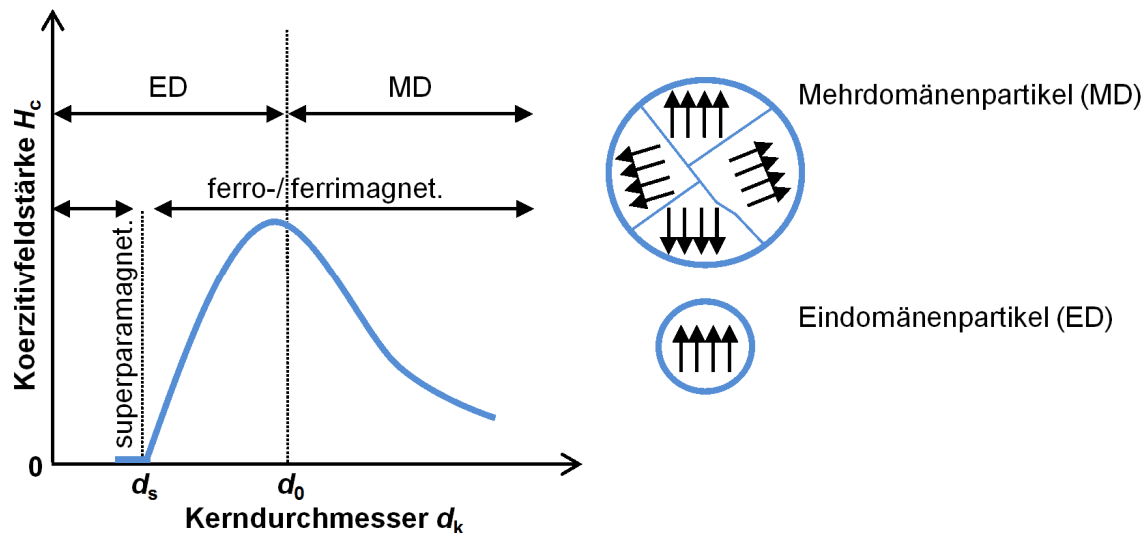


Abb. 7.1: Magnetische Eigenschaften der Partikel gezeigt am Verlauf der zeitlich gemittelten Koerzitivfeldstärke  $H_c$  in Abhängigkeit von der Partikelgröße ( $d_k$ ), bei  $d_s$ : Übergang zum intrinsischen Superparamagnetismus und  $d_0$  Übergang zum Mehrdomänenpartikel,<sup>[153,156]</sup> Abbildung nach Heim.<sup>[156]</sup>

### 7.1.2 Möglichkeiten zur Synthese von Metalloxidnanopartikeln

In diesem Teil der Arbeit wird eine kurze Übersicht für die verschiedenen Synthesemöglichkeiten von magnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln gegeben (siehe Tabelle 7.1). Die erste Methode zur Herstellung von Eisenoxidpartikeln war das Zermahlen von grobkörnigen Materialien in organischen Lösungsmitteln und Ölsäure in Kugelmøhlen. Dieses Top-Down-Verfahren ist kosten- und zeitintensiv und liefert Partikel in einer breiten Größenverteilung und wird nicht weiter thematisiert.<sup>[97]</sup>

Das Bottom-Up-Verfahren, also der Aufbau von Partikeln aus kleineren Einheiten wird im Folgenden erklärt, wobei Mikroemulsionsverfahren, Hydrothermalsynthese und thermische Zersetzung nur kurz umrissen werden können. Der Schwerpunkt liegt in dieser Arbeit auf dem Präzipitationsverfahren.

Tabelle 7.1: Übersicht der Synthesemethoden von Eisenoxid-Nanopartikeln.<sup>[157]</sup>

Methode	Präzipitation	Thermische Zersetzung	Emulsionsverfahren	Hydrothermalsynthese
<b>Synthese</b>	sehr einfach, Normalbedingungen	schwierig, Inertgas	schwierig, Normalbedingungen	einfach, hoher Druck
<b>Reaktions-temperatur [°C]</b>	20 - 90	100 - 320	20 - 50	220
<b>Reaktionszeit</b>	Minuten	Stunden-Tage	Stunden	Stunden-Tage
<b>Lösungsmittel</b>	Wasser	organische Verbindung/en	organische Verbindung/en	Wasser/EtOH
<b>Größenverteilung</b>	relativ eng	sehr eng	relativ eng	sehr eng
<b>Formkontrolle</b>	nicht gut	sehr gut	gut	sehr gut
<b>Ausbeute</b>	hoch/ skalierbar	hoch/ skalierbar	niedrig	mittel
<b>Preis</b>	günstig	teure Reagenzien	günstig	Spezialautoklaven

### Hydrothermalsynthese

Die Hydrothermalsynthese ist ein Verfahren, bei dem durch Kristallisation von hocherhitzten Lösungen mineralische Nanopartikel, vorwiegend Silicate und Oxide, aus Mischungen von Salzen, Oxiden oder Hydroxiden gewonnen werden. Ein Beispiel ist die Synthese von Eisenoxid-Nanopartikeln aus Eisen(III)chlorid in Wasser mit Ascorbinsäurezusatz bei 160 °C für 3 h in einem Autoklaven.<sup>[158]</sup>

### Emulsionsverfahren

Eine thermodynamisch stabile Dispersion von zwei nicht mischbaren Flüssigkeiten wird als Mikroemulsion bezeichnet. Durch den Zusatz von grenzflächenaktiven Molekülen, wie Tensiden, können Mikrodömanen einer oder beider Flüssigkeiten stabilisiert werden. So entstehen Reaktionszellen im Nanometerbereich. Werden zwei identische Mikroemulsionssysteme, die jeweils einen der Reaktanden enthalten, gemischt, präzipitiert das Produkt durch Koaleszenz und Zerfall der Mikrotröpfchen. Die Zugabe von weiteren Lösungsmitteln oder Zentrifugation ermöglicht die Produktabtrennung. Bedingt durch die Reaktionsbedingungen, also die Tropfengröße, liegen die Produkte in einer relativ breiten Größenverteilung vor.<sup>[157]</sup> Die Emulsionstechnik wird vorwiegend zum Coating von metallischen Nanopartikeln eingesetzt. Die Verkapselung von Magnetitnanopartikeln in einer Polystyrolmatrix unter Verwendung von Miniemulsionen wurde beschrieben.<sup>[159]</sup> Es ist aber auch möglich, Spinellferrite  $MFe_2O_4$  (M: Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Mg, Cd etc.) in Mikroemulsionen (und auch in inversen Micellen) herzustellen. Ein Beispiel ist die Synthese von  $MnFe_2O_4$ -Nanopartikeln durch die Bildung inverser Wasser-in-Toluol-Micellen mit Natriumdodecylbenzolsulfonat als Tensid.<sup>[160]</sup>

Neben den Mikroemulsionen gibt es auch Miniemulsionen. Hierbei handelt es sich um spezielle Heterophasensysteme aus sehr kleinen, dispergierten Tröpfchen, die durch sehr

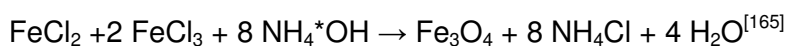
hohe Scherkräfte (z.B. Ultraschall oder Hochdruckhomogenisator) in einer kontinuierlichen Phase hergestellt werden. Diese müssen mit oberflächenaktiven Substanzen gegen Koaleszenz und zusätzlich gegen die Ostwald-Reifung stabilisiert werden. Nanopartikuläre Systeme resultieren. Der Vorteil von Emulsionssystemen sind die vielen verschiedenen Möglichkeiten, Reaktionssysteme für die Synthese von Nanostrukturen zu schaffen. Es kann jedoch sehr zeitaufwändig sein, das geeignete System für das jeweilige Syntheseziel zu entwickeln.<sup>[161,162]</sup>

### Thermische Zersetzung

Auch durch thermische Zersetzung von metallorganischen Verbindungen lassen sich magnetische Nanopartikel herstellen. Typische Vorstufen sind Metallacetylacetonate, die in Gegenwart eines stabilisierenden Tensids zuerst in das Metall an sich (mit der Oxidationsstufe null) überführt und anschließend oxidiert werden. Die Größenverteilung dieser Partikel ist sehr eng und gut steuerbar. Auch die Morphologie und Größe sind durch die Reaktionsbedingungen einstellbar. Die Synthese von monodispersen  $MFe_2O_4$ -Nanopartikeln in Gegenwart von Hexadecandiol, Ölsäure und 1-Amino-9-octadecen mit verschiedenen Metallacetylacetonaten (Fe, Co, Mn) und in unterschiedlichen Größen ist beschrieben.<sup>[163,164]</sup> Nachteilig ist der hohe Preis der metallorganischen Vorstufen.

### Präzipitation

Die Fällung von  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  Salzlösungen ist die einfachste und kostengünstigste Methode zur Synthese von Eisenoxidpartikeln. Zusammensetzung, Größe und Morphologie der entstehenden Partikel sind von den verwendeten Salzen (Chloride, Sulfate, Nitrate), dem  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$ -Verhältnis, dem pH-Wert und der Reaktionstemperatur abhängig.



Die bestimmenden Vorgänge bei dieser Art von Synthese sind Nucleationsprozess und Kristallwachstum. Eine homogene Nucleation tritt auf, wenn die Übersättigung einen kritischen Wert erreicht. Die durch Zusammenstöße entstehenden Kristallisationskeime sind einem ständigen Zerfalls- und Neubildungsprozess unterworfen, welcher von der freien Oberflächenenergie  $\Delta G_{\text{Oberfläche}}$  und der entgegengesetzten Bindungsenergie  $\Delta G_{\text{Binudnug}}$  bestimmt wird. Die freie Nucleationsenergie  $\Delta G_N$  ist die Summe aus beiden Energien. Nur wenn die entstehenden Partikel eine bestimmte Größe überschreiten, dominiert die Bindungsenergie und es kommt zum Kristallwachstum. Wichtig für eine enge Teilchengrößenverteilung und damit für ein einheitliches magnetisches Verhalten der Partikel ist ein kurzer Nucleationsimpuls, dem eine langsame kontrollierte Wachstumsphase folgt.<sup>[166]</sup>

### 7.1.3 Stabilisierung und Funktionalisierung von Eisenoxid-Nanopartikeln

Die Herausforderung bei der Synthese von Eisenoxid-Nanopartikeln ist es, die Größe, Form, Beständigkeit (z.B. Schutz vor Oxidation), Dispergierbarkeit und vor allem die Stabilität (z.B. Schutz vor Agglomeration) im gewünschten Lösungsmittel zu kontrollieren. Nanostrukturierte Materialien haben ein großes Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis und damit hohe Oberflächenenergien. Beispielsweise werden Magnetitpartikel unter Luftwirkung sehr schnell zu Maghemit oxidiert. In stark saurer Umgebung werden sie aufgelöst. Agglomerat- und/oder Präzipitatbildung sind weitere Probleme. Oberflächenstabilisierende Maßnahmen sind daher bei allen Synthesen notwendig. Stabilisatoren werden entweder vor oder nach der Reaktion zugegeben. Zum Schutz der Partikel gibt es verschiedene Strategien, die in Tabelle. 7.2 zusammengefasst sind.

Tabelle. 7.2: Möglichkeiten zur Stabilisierung von magnetischen Nanopartikeln.<sup>[157]</sup>

Stabilisierung	Material	Wirkung
<b>Organische Hülle</b>	Polymere	elektrostatische und
	Tenside	sterische Abstoßung
	Carbonsäuren uvm.	verhindern Agglomeration
<b>Anorganische Hülle</b>	Kohlenstoff	Oxidationsschutz
	Silicate	
	Edelmetalle	
<b>Oberflächenpassivierung</b>	O <sub>2</sub>	kontrollierte Oxidation
<b>Matrixdispersion</b>	Polymer	Oxidationsschutz
	Silicate	
	Kohlenstoff	

Werden magnetische Nanopartikel mit Polymeren beschichtet bzw. funktionalisiert, handelt es sich um Kompositmaterialien. Je nach Herstellungsverfahren und verwendeten Materialien ergeben sich verschiedene Morphologien (Abb. 7.2). Neben den zumeist gezeigten Core-Shell-Strukturen wie „single core“ und „brush“ gibt es Multikernpartikel, bei denen sich die magnetischen Partikel entweder in oder auf der Polymermatrix befinden.

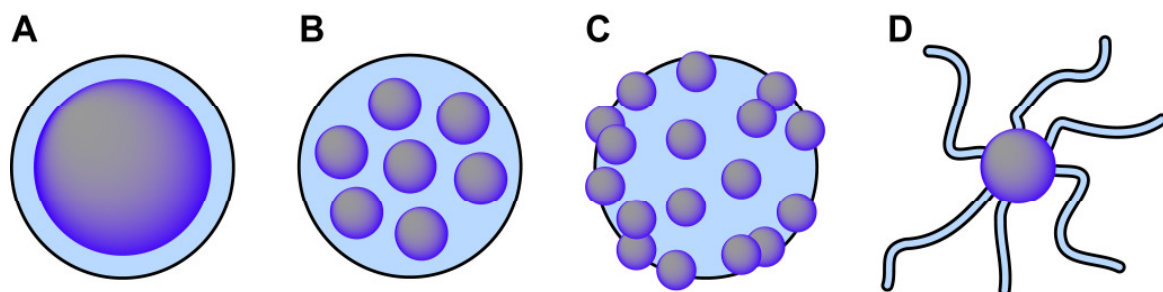


Abb. 7.2: Verschiedene Morphologien von Eisen-Komposit-Strukturen (a) single core, (b) multi-core, (c) strawberry und (d) brush (hair) Morphologie. Abbildung nach Horák.<sup>[97]</sup>

Der Grund zur Beschichtung (Coating) von Metalloxidnanopartikeln ist zum einen die Aufrechterhaltung der Stabilität einer Nanopartikeldispersion (Oxidations-, Aggregations- und Agglomerationsschutz), zum anderen ermöglicht sie, wie in Abb. 7.3 gezeigt, die Funktionalisierung durch Bindung von multifunktionalen Rezeptoren. Dies können Signalmoleküle, Antikörper (Immunglobuline), Arzneimittel, Enzyme, verschiedene Alkylgruppen oder auch ganze Zellen sein. Applikationen zur magnetischen Bioseparation oder Detektion von Bestandteilen in biologischen Systemen, wie z.B. von Zellen, Proteinen, Enzymen, Bakterien sind möglich. Weitere Anwendungsbeispiele von beschichteten Eisenoxid-Nanopartikeln sind in der klinischen Diagnostik und in Therapieformen wie Magnetic Resonance Imaging (MRI) oder Magnetic Fluid Hyperthermia (MFH) zu finden.<sup>[151,157]</sup>

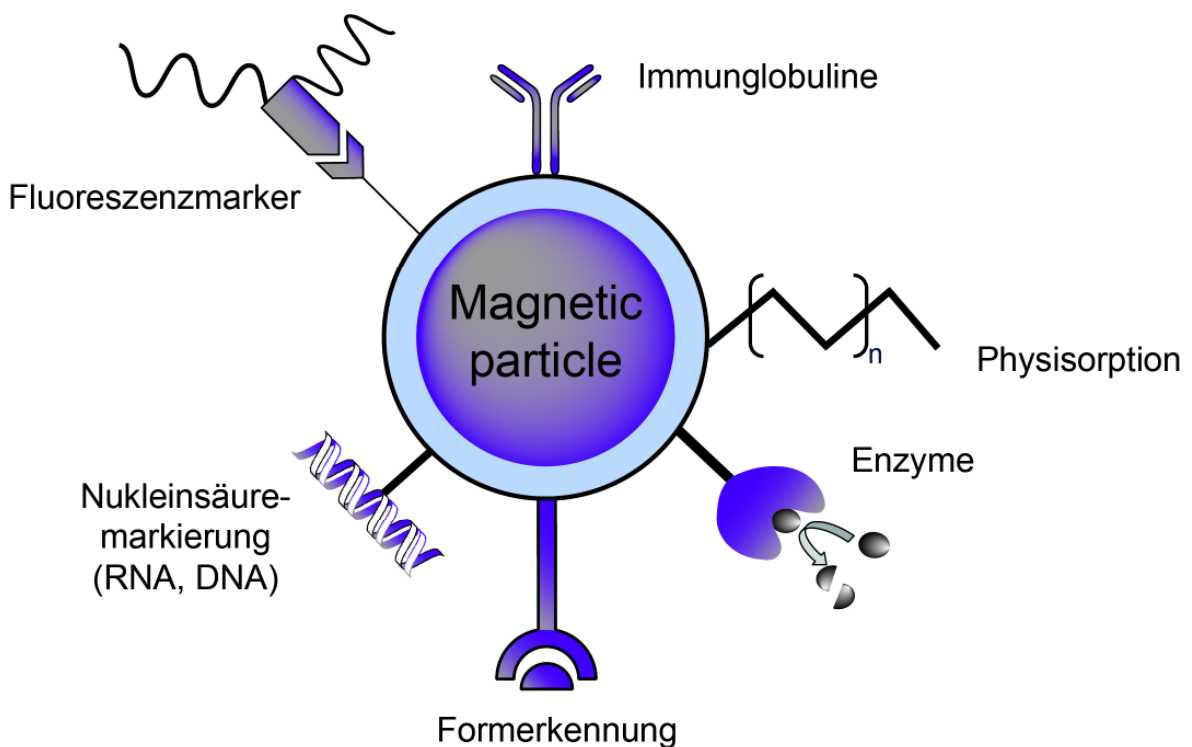


Abb. 7.3: Beispiele für die Funktionalisierung Polysaccharid-beschichteter Eisenoxid-Nanopartikel.<sup>[93,167]</sup>

Im Fall der in dieser Arbeit durchgeführten Präzipitation von Eisenoxiden aus Eisensalzlösungen durch Basenzusatz wird durch die anschließende Ansäuerung auf pH 2 die Oberfläche der Partikel teilweise oxidiert und durch die entstehende Oxidschicht passiviert, bevor in einem weiteren Schritt die Funktionalisierung mit modifizierten Glucanen erfolgt.

## 7.2 Methoden zur Charakterisierung von Nanopartikeln

Die wichtigsten Faktoren zur Charakterisierung von nanoskaligen Materialien sind:

- Partikelgröße (-durchmesser, -volumen, -oberfläche)
- Partikelform (Morphologie)
- Zusammensetzung bzw. chemische Eigenschaften
- Kristallinität (Dichte, optische Eigenschaften)
- Oberflächenbeschaffenheit

Die Methoden zur Analyse von Nanopartikeln sind zahlreich und müssen je nach Partikelart und Matrix ausgewählt und angepasst werden. In Tabelle 7.3 ist eine kurze Übersicht für die Möglichkeiten zur Analytik von nanoskaligen Materialien gegeben.

Tabelle 7.3: Übersicht verschiedener Methoden zur Charakterisierung von Nanomaterialien. (Da zumeist die englischen Begriffe genutzt werden, wird auf eine Übersetzung verzichtet.) Zusammengestellt aus<sup>[168]</sup> weitere Modifikationen nach<sup>[169]</sup> und<sup>[170]</sup>.

Method	Acronym	Advantage	Disadvantage	Information
<b>Microscopy and related imaging methods</b>				
Near field-scanning optical microscopy	NSOM	optical imaging	spatial resolution	sizing visualisation
Scanning electron microscopy	SEM	high resolution	high vacuum sample preparation	
Transmission electron microscopy	TEM	high resolution	high vacuum sample preparation	
Scanning transmission electron microscopy	STEM	for low concentrations		
X-ray microscopy	XRM	composition inner of sample accessible	radiation damage	
Scanning transmission X-ray microscopy	STXM	no sample preparation		
Atomic force microscopy	AFM	dry, moist or liquid samples 3 D surface topography	artifacts due to movement of the tip (smearing)	sizing electrical and mechanical properties visualization
<b>Chromatographic and related methods</b>				
Size exclusion chromatography (SEC), GPC	SEC, GPC	good separation efficiency simple	solvent and column interactions limited size separation range	separation sizing
Asymmetric flow field flow fractionation	AFFFF	direct relation between retention time and size mild fractionation	demands experience, membrane interactions	size distribution hydrodynamic diameter size separation

Method	Acronym	Advantage	Disadvantage	Information
<b>Spectroscopy and related methods</b>				
Light scattering	DLS, QUELS, MALS, PCS LIBD	rapid, simple	interpretation difficult dust particle can ruin the measurements	hydrodynamic diameter size distribution molecular weight structure properties
Laser-induced breakdown detection		highly sensitive	no elemental information	size concentration
Raman und IR Spectroscopy		compatible with wet suspensions		oxidation state structure
UV-VIS Spectroscopy		in situ functional groups	insensitive	quantitative analysis structure and size information
Nuclear magnetic resonance spectroscopy	NMR	liquids and solids	lack of available standards	structure
<b>Charge characterization</b>				
Zetapotential	CE	electro kinetic potential		electrophoretic mobility surface potential
Capillary electrophoresis		sensitive, fast separation by charge	mobile phase interactions need of standard material	electrophoretic mobility sizing separation of ionic species
Polarography Contact angle		qualitativ and quantitativ surface hydrophobicity quick	solution necessary not specific	quantitativ and qualitative
<b>X-ray methods</b> (~absorption, ~diffraction, ~microscopy, ...)		composition inner of sample accessible	radiation damage	structure elemental composition
<b>Centrifugation and filtration</b>		low surface effects	aggregation	
Ultracentrifugation		dispersions high resolution	expensive equipment	sedimentation speed
Filtration		fast, low coats	clogging	



Im Folgenden werden die Methoden zur Charakterisierung von Nanomaterialien vorgestellt, die in dieser Arbeit Anwendung finden.

## Lichtstreuung

Zu einer schnellen Charakterisierung von Größen und Größenverteilungen bieten sich Lichtstreuungsexperimente an. Es gibt zwei Verfahren, die statische Lichtstreuung (MALS) und die dynamische Lichtstreuung (DLS, QUELS: quasielastische Lichtstreuung oder auch PCS Photonenkorrelationsspektroskopie genannt), deren Grundlage die Messung von einem zeitlich fluktuierenden Streulichtsignal ist, dass von Partikeln in Lösung aufgrund der Brownschen Molekularbewegung aus einem eingestrahlten Laserstrahl erzeugt wird. In Abb. 7.4 ist der Aufbau einer Messanordnung für Lichtstreuungselemente dargestellt. Mittels Laserquelle wird Primärlicht in eine Messzelle gestrahlt. Die Intensität des Streulichts wird detektiert und analysiert.

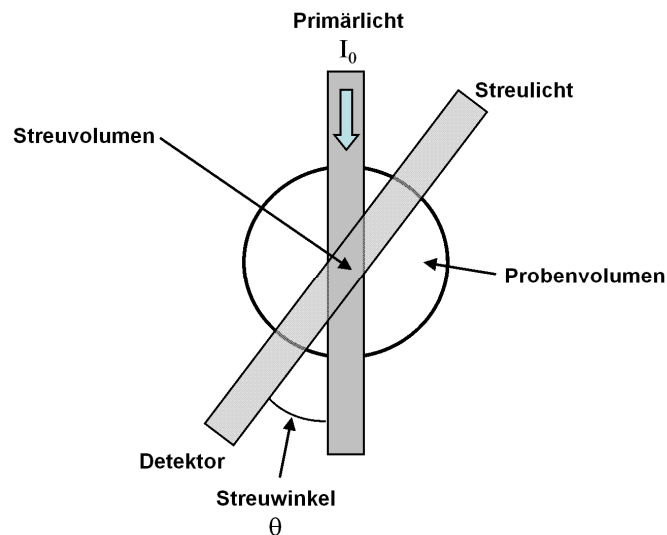


Abb. 7.4: Allgemeiner Aufbau einer Messanordnung für Lichtstreuungsexperimente. Abb. nach Schärfl.<sup>[171]</sup>

Bei der statischen Lichtstreuung (MALS) handelt es sich um eine Absolutmethode, bei der die molare Masse und der Gyrationsradius eines Teilchens über die zeitlich gemittelte Intensität des Streulichts bestimmt werden können. Entdeckt wurde dieses Verfahren von Rayleigh und Tyndall. Von Debye und Faraday wurde die Anpassung auf größere Partikel vorgenommen. Es gibt zahlreiche mathematische Beschreibungen und theoretische Überlegungen zur Auswertung von Lichtstreuungsexperimenten, von denen hier aber nur die wichtigsten kurz umrissen werden können. Licht kann als oszillierende Welle von elektrischen und magnetischen Feldern beschrieben werden. Beim Zusammentreffen mit Materie kommt es zur Interaktion. An dem streuenden Partikel wird ein Dipol induziert, der dann wiederum elektromagnetische Strahlung mit der gleichen Frequenz wie das eingestrahlte Licht emittiert. Das Dipolmoment ( $\mu$ ) ändert sich mit der eingestrahlten

Frequenz und ist proportional zur Stärke des elektromagnetischen Feldes ( $E$ ) (siehe Gleichung (7.1)).

$$\mu = \alpha * E \quad (7.1)$$

Die Intensität der Streustrahlung wird nun durch die zeitliche Änderung der Dipolmomente bestimmt (Fluktuation). Sind die streuenden Partikel viel kleiner als die Wellenlänge des einfallenden Lichts ( $\lambda/20$ ), so wird von Rayleigh-Streuung gesprochen. Ein Beispiel für diese Streuung ist die blaue Erscheinung des Himmels. Die auf der von Rayleigh postulierten Theorie basierende Streuformel stellt den Zusammenhang von Molmasse ( $M$ ) und Streustrahlung ( $R$ ) dar. Es wird idealisiert von isolierten Gasmolekülen ausgegangen (siehe Gleichung (7.2)).

$$R_{\theta} = \frac{I_s}{I_0} = \frac{\pi^2 \alpha^2 N_A \rho}{2 \epsilon^2 \lambda^4 r^2 M} \times (1 + \cos^2 \theta) \quad (7.2)$$

- R: Rayleigh Verhältnis (winkelabhängig)
- $\theta$ : Beobachtungswinkel
- $I_s$ : Streulichtintensität
- $I_0$ : Intensität der einfallenden Strahlung
- $\alpha$ : Polarisierbarkeit
- $N_A$ : Avogadrozahl
- $\rho$ : Dichte des Streumediums
- $\epsilon$ : Dielektrizitätskonstante
- $\lambda$ : Wellenlänge des Lichts im Vakuum
- $r$ : Abstand Detektor - Streuzentrum
- $M$ : Molekulargewicht
- $\theta$ : Streuwinkel

Bei der Messung von Streuung in Flüssigkeiten, wird die räumliche und zeitliche Fluktuation in Volumenelementen und nicht die Polarisierbarkeit des Streuelements an sich betrachtet. Die Teilchen liegen nicht mehr isoliert vor. Die Lösungsmittelmoleküle streuen ebenfalls. Durch die Abhängigkeit des Streulichts vom Molekulargewicht, streuen jedoch die gelösten Moleküle viel stärker und ihr Beitrag kann durch Subtraktion der Lösungsmittelstreuung von der Gesamtstreuintensität berechnet werden. Im Modell von Rayleigh sind diese Interaktionen nicht enthalten und es musste erweitert werden. Hierzu werden u.a. die Einstein-Smoluchowski-Gleichung und Virialkoeffizienten herangezogen. Bei der Messung von Molekülen, die größer als  $\lambda/20$  sind ist zudem die intermolekulare Interferenz, bedingt durch das Auftreten von mehreren Streuzentren, zu berücksichtigen. Wenn zwei phasenverschobene Lichtwellen miteinander interferieren, dann ist die

resultierende Streulichtintensität geringer, als die Summe von zwei isolierten Streuzentren. Diese Abschwächung ist ebenfalls von der Molekülmasse abhängig. Der Vergleich der resultierenden Intensitäten bei verschiedenen Messwinkeln gibt damit Rückschlüsse auf die Molmasse. Die Streulichtintensität von großen Teilchen ist bei Verwendung von linearpolarisiertem Licht winkelabhängig und es lassen sich mithilfe von Streufunktionen Aussagen über die Form der Partikel treffen. Es muss aber berücksichtigt werden, dass die Intensität der Lichtstreuung immer auch von Beobachtungswinkel, Konzentration, Partikelgrößenverteilung, der Zusammensetzung der zu untersuchenden Partikel (z.B. Verzweigungen), von der Morphologie und von Aggregation der Teilchen beeinflusst wird. Unterschiedliche Moleküle führen zu unterschiedlichen Streufunktionen. Zur Datenauswertung gibt es daher verschiedene mathematische Modelle (z.B. Debye-Plot), in denen intermolekulare und intramolekulare Streueffekte berücksichtigt werden. Die Methode der statischen Lichtstreuung ermöglicht also die Bestimmung von absoluten Molmassen und erlaubt Aussagen über Form und Wechselwirkungen von Teilchen.<sup>[171-173]</sup>

Bei der Dynamischen Lichtstreuung kann der hydrodynamische Radius von Teilchen bestimmt werden. Hier wird die zeitliche Änderung (=Fluktuationen) der Streulichtintensität betrachtet. Durch die Brownsche Molekularbewegung kommt es zu einer zeitlich veränderten Interferenz des Streulichts. Diese Interferenzen werden in sehr kurzen Intervallen als Funktion der Zeit gemessen. Je kleiner die Partikel sind, desto schneller ändern sich die Fluktuationen der Lichtintensität. Werden Streulichtintensitäten aus zwei Intervallen, die räumlich auseinander liegen, verglichen, können Intensitätsfluktuationen analysiert werden. Verschieden große Teilchen erzeugen hierbei unterschiedliche Schwankungen, die sich auch überlagern. Durch Autokorrelationsanalysen können sie separiert werden. Abbildung 7.5 stellt diesen Zusammenhang graphisch dar.

Zur Ermittlung einer Autokorrelationsfunktion wird die Streulichtintensität zu einem gegebenen Zeitpunkt ( $t_0$ ) mit der Streuintensität aus einem kurzen Intervall weiter ( $t_1$ ) multipliziert. Dies wird vielfach wiederholt, bevor ein Mittelwert aus den einzelnen Produkten berechnet wird. Durch die Art und Weise wie die Korrelationsfunktion auf einen konstanten Wert relaxiert wird, werden Informationen über den Diffusionskoeffizienten (Stokes-Einstein-Gleichung) und damit die Teilchengröße zugänglich. Größere Streuelemente bewegen sich langsamer und so schwanken auch die Intensitäten langsamer und in der Autokorrelationsfunktion ist ein späterer Abfall zu erkennen. In Abbildung 7.5 wird dies mit den schnelleren Fluktuationen von kleineren Partikeln verglichen, die einen früheren Abfall zeigen.<sup>[171-173]</sup>

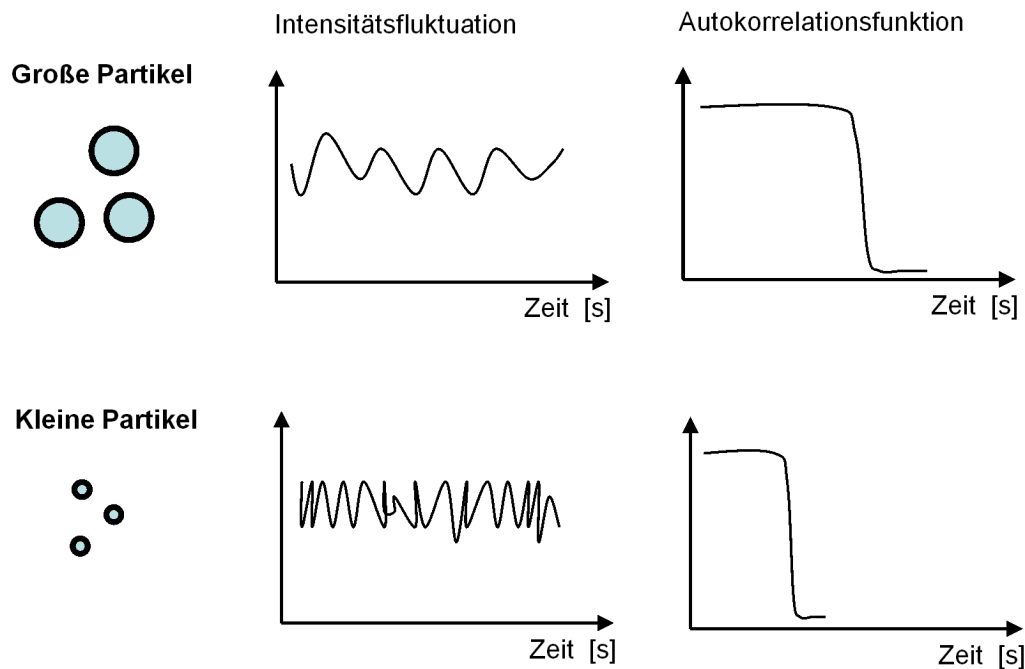


Abb. 7.5: Zusammenhang zwischen Intensitätsfluktuation und Autokorrelationsfunktion für unterschiedliche Teilchengrößen. Abb. nach Berne<sup>[173]</sup>

Die Lichtstreuexperimente wurden am Institut für Partikeltechnik der TU Braunschweig mit einem Zetasizer (Ver 6.0.1) von Malvern Instruments durchgeführt. Zu Vergleichs- und Testmessungen konnten am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (Braunschweig) das Dyna Pro Lichtstreuungssystem der Firma Wyatt genutzt werden.

## Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskope haben das gleiche Funktionsprinzip wie Lichtmikroskope, nur dass anstelle von Lichtstrahlen hochenergetische, d.h. kurzwelligere Elektronenstrahlen verwendet werden. Dadurch wird eine viel höhere Auflösung (0,0039 nm bei 100 kV) erreicht, da die Wellenlänge von Elektronen viel kleiner als die von Lichtwellen (Auflösung: 500 nm) ist.

In der Transmissionselektronenmikroskopie wird das Präparat mit Elektronen durchstrahlt, wobei es zu unterschiedlichen Wechselwirkungen mit den Präparatatomten kommt. Für die Abbildung von Objektstrukturen dient hauptsächlich der Streukontrast, der auf der hohen Ablenkung von Strahlelektronen bei der Kollision mit Atomkernen hoher Atommassen, der sogenannten Rutherford-Streuung, beruht und über die Kontrastblende aus dem resultierenden Bild ausgeblendet wird und so den Kontrast im Bild erzeugt. Bei Aufnahmen mit Rasterelektronenmikroskopen (REM), die im Englischen als Scanning Electron Microscopes (SEM) bezeichnet werden, wird die Probenoberfläche mit einem punktförmig-fokussierten Elektronenstrahl abgerastert. Als Strahlenquellen werden Wolfram-Glühkathoden, Lanthanhexaborid-Kristalle oder Feldemissionskathoden einge-

setzt. Anstelle von optischen Linsen (Glas), müssen Elektronenlinsen verwendet werden. Es handelt sich hierbei um elektromagnetische Linsen, die aus Spulen aufgebaut sind. Ihre Brennweite, und somit ihre Fokussierung, wird durch Veränderung der magnetischen Feldstärke über die Stromstärke reguliert.

Bedingt durch den Einsatz von Elektronenstrahlen muss die Messung im Vakuum erfolgen, da nur so eine ausreichend lange freie Weglänge des Strahls ohne Abschwächung durch Zusammenstöße mit Gasteilchen (inelastische Streuung) realisiert werden kann. Nur so wird die Wellenlänge und somit die Abbildungsqualität („optische Qualität“ der Strahlelektronen) nicht vermindert. Eine entsprechende Präparation der Proben für die TEM-Analyse ist notwendig. Um die Entstehung von Wasserdampf im Vakuum zu vermeiden, muss das Probenmaterial vollständig entwässert werden. Metalle sind aufgrund ihrer Leitfähigkeit ohne weitere Vorbereitung als luftgetrocknetes Material detektierbar.

Trifft der Elektronenstrahl auf die Probe, so kann er entweder, wie bei Transmissionsmessungen, hindurchgehen oder aber unterschiedliche Arten von Elektronen durch Wechselwirkung mit der Probe erzeugen und damit die Detektion von spezifischen Eigenschaften der Probe ermöglichen (vergleiche Abb. 7.6, für ein REM-Präparat). Die vom Primärelektronenstrahl herausgeschlagenen Elektronen werden als Sekundärelektronen (SE) bezeichnet. Sie sind energieärmer und werden im REM in Verbindung mit dem Rastervorgang zur Darstellung der Probenoberfläche genutzt. Die Verteilung dieser Sekundärelektronen wird mit dem SE-Detektor erfasst und für die Intensitätssteuerung eines parallel-geschalteten Elektronenstrahls des Darstellungsmonitors verwendet, wodurch das REM-Bild (indirekte Abbildung) entsteht und die Objektoberfläche dargestellt wird. Die dreidimensional wirkende Ansicht von REM-Aufnahmen entsteht dadurch, dass an den Kanten deutlich mehr Elektronen austreten, sodass diese Bereiche heller dargestellt werden (Kanten-Effekt).

Durch den hohen Energieeintrag des Elektronenstrahls kommt es zur Ionisation von Elektronen auf dem jeweiligen Elektronen-Energieniveau (K-, L-, M-, N-Schalen) der Atome und die freien Plätze in den Schalen werden durch Elektronen höherer Schalen unter Abgabe von Röntgen-, Licht oder Wärmestrahlung aufgefüllt. Durch die Wellenlänge und Energie der emittierten Röntgenstrahlung kann die elementare Zusammensetzung der Probe ermittelt werden.

Rückstreuelektronenbilder entstehen aus mehrfach elastisch gestreuten Elektronen. Sie werden mit einem zusätzlichen (Rückstreuelektronen-)Detektor vorwiegend in der REM-Analytik aufgezeichnet und liefern Informationen über Ordnungszahl und Neigungswinkel. An schweren Elementen werden Elektronen in einem größeren Winkel gestreut und es entstehen im Gegensatz zu leichten Elementen mehr Rückstreuelektronen. REM-Proben

werden deshalb vorwiegend mit einem (nur wenige Nanometer dicken) Gold-Film überzogen.

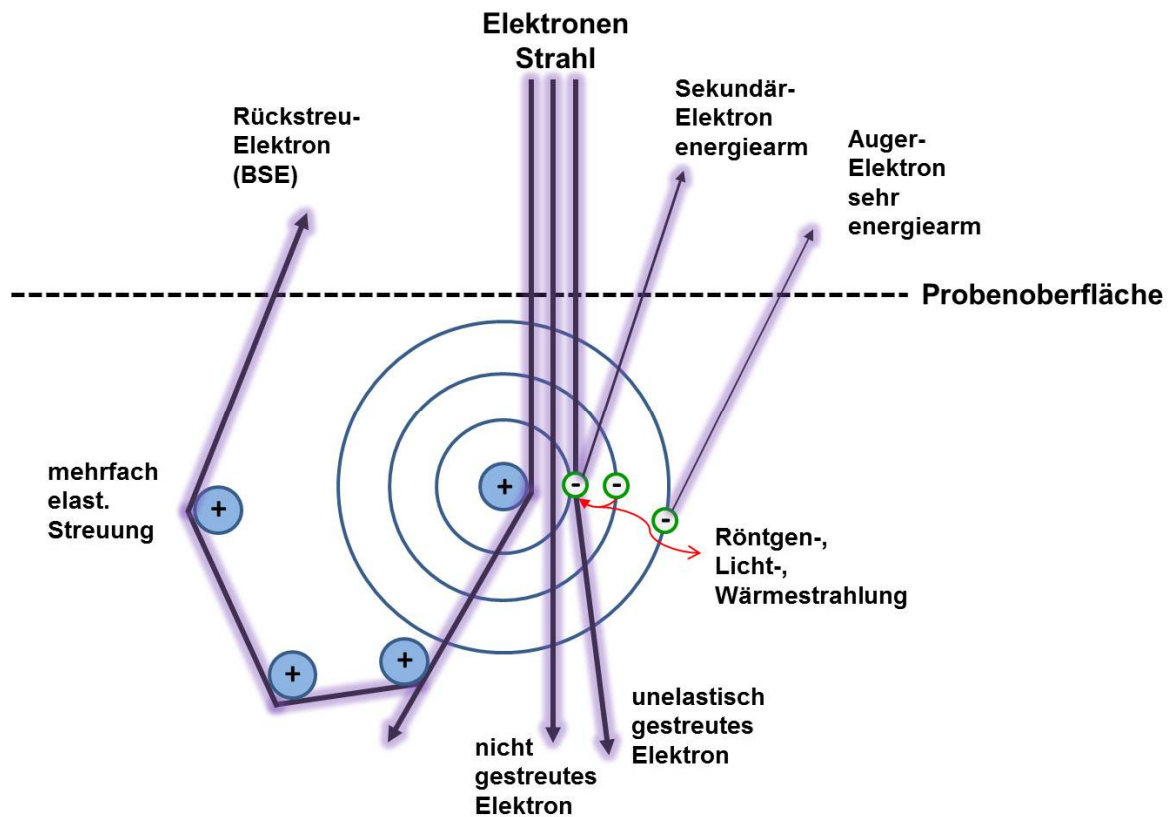


Abb. 7.6: Wechselwirkung von Elektronenstrahl und Probe, Streuarten.<sup>[174]</sup>

Die Elektronen-Energieverlustspektroskopie (EELS: Electron Energy Loss Spectroscopy) misst den Energieverlust der Primärelektronen nach Wechselwirkung mit den Proben-Elektronen aufgrund inelastischer Streuung. Neben der Detektion und Identifizierung der jeweiligen Elemente, gibt sie Informationen über die chemische Zusammensetzung und die Valenzzustände der einzelnen Elemente bis in den Nanobereich der Probe an. Die gleichzeitige Registrierung von Elektronen-Energieverlusten mittels eines CCD-Sensors über einen gegebenen Energiebereich  $\Delta E$  (variabel von ca. 50 bis 600 eV) wird als PEELS (Parallel Electron Energy Loss Spectroscopy) bezeichnet und stellt die heute meist verwendete Spektrumsaufzeichnung dar.<sup>[174-177]</sup> Unter Verwendung einer Spaltblende mit einem Energiedurchlass von nur wenigen Elektronenvolt lassen sich Elementverteilungsbilder eines Elementes über seinen spezifischen Energieverlust, z.B. seiner L-Kante, erstellen, die eine hohe Ortsauflösung bei geringen Lokalkonzentrationen (des gegebenen Elementes) zeigen.

Für die Aufnahme von elektronenmikroskopischen Bildern standen für diese Arbeit ein EF-TEM Libra 120 plus Zeiss (Germany) Mikroskop am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung und ein Hitachi S-4800 FE-SEM (Tokyo, Japan) an der KTH (Royal Institute of Technology) in Stockholm zur Verfügung.

Die Aufnahmen der elektronenmikroskopischen Bilder wurden von Dr. Heinrich Lünsdorf (TEM) und Sevil Atarijabarzadeh (SEM) durchgeführt.

### **Magnetrelaxometrie superparamagnetischer Nanopartikel (MRX)**

Die Magnetrelaxometrie ist ein schnelles Verfahren zur Analyse von magnetischen Nanopartikeln, die Kern- als auch hydrodynamische Eigenschaften einschließt. Die magnetischen Momente von superparamagnetischen Nanopartikeln werden entlang den Feldlinien eines angelegten Magnetfeldes ausgerichtet und relaxieren nach Abschalten dieses Feldes wieder in eine zufällige Ausrichtung, wobei dieser zeitliche Abfall von Größe bzw. Beweglichkeit der Nanopartikel abhängig ist. Schon 1968 wurde der Zusammenhang zwischen Größe und Sättigungsmagnetisierung anhand von  $\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$  Partikeln untersucht.<sup>[178]</sup> Es gibt zwei Relaxationsarten für die magnetischen Momente von superparamagnetischen Teilchen. Die Brown-Relaxation beschreibt die Relaxation für frei bewegliche Partikel, wie sie z.B. in Dispersionen vorliegen. Wird ein äußeres Magnetfeld angelegt, so erfolgt die Ausrichtung bzw. Drehung des gesamten Nanopartikels mit seinem Magnetisierungsvektor in Richtung des angelegten Feldes. Nach Anschalten des Feldes rotieren die Partikel aufgrund Brownscher Molekularbewegung mit ihrer Magnetisierung in eine magnetische Gleichverteilung. Angelagerte Moleküle oder Hüllen der magnetischen Partikel werden mit bewegt, sodass stets das hydrodynamische Partikelvolumen betrachtet werden muss. Sind die magnetischen Nanopartikel an Biomarker gebunden, so ändert sich das Relaxationsverhalten durch eine Verlangsamung der Brownschen Molekülbewegung. Eine quantitative Erfassung der gebundenen Partikel ist direkt messbar. Die Néel-Relaxation tritt bei immobilisierten Partikeln (z.B. in einer Mannit- oder Kalkmatrix) auf und beschreibt die innere Drehung des Magnetisierungsvektors.

Der Aufbau eines Messgerätes für Relaxionsmessungen besteht aus einem Helmholtz-Spulen-System, das zur stufenförmigen Aufmagnetisierung der Probe dient. Durch zwei in differentieller Anordnung enthaltenen Fluxgate-Magnetometer (Sensoren) wird das Signal der Probe detektiert. Durch diese Anordnung werden magnetische Störsignale der Umgebung nicht erfasst und das Signal-zu-Rausch-Verhältnis wird durch die doppelte Erfassung der Messwerte verbessert. Die Messungen können bei Raumtemperatur und ohne spezielle Abschirmkammern durchgeführt werden.<sup>[156,178-180]</sup>

### **Magnetpartikelspektroskopie (MPS)**

Mit dem Verfahren der Magnetpartikelspektroskopie können die magnetischen Eigenschaften von magnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln durch die Darstellung der nichtlinearen Magnetisierungsfähigkeit bestimmt werden. Diese Partikel sind bis zu einer Größe von 30 nm superparamagnetisch und zeigen keine Hysterese.<sup>[151,181]</sup> Die

Magnetpartikelspektroskopie basiert auf demselben Verfahren wie das „Magnetic Particle Imaging“ (MPI = Bildgebungsmethode zur Abbildung der räumlichen Dichteverteilung von magnetischen Partikeln in biologischen Systemen). Eine räumliche Auflösung erfolgt beim MPS nicht, sodass auch von 0-dimensionalem MPI gesprochen werden kann.

Die Probe wird in ein nach der Zeit sinusförmig oszillierendes aber räumlich homogenes Feld gebracht (Anregungsfeld). Die nichtlineare Magnetisierungskurve der Eisenpartikel wird periodisch abgefahren, d.h. die Partikel werden mit hoher Frequenz in den Zustand der magnetischen Sättigung gebracht und anschließend wieder entmagnetisiert. Wird die Magnetisierung der Teilchen als Funktion der Zeit aufgetragen, so ist sie nicht mehr sinusförmig, aber noch periodisch zur Frequenz des Ansteuerungsfelds. Sie enthält sowohl die Harmonischen (= Oberwellen) als auch die Frequenz des eingestrahlten Feldes. Durch Fourier-Transformation des induzierten Signals können die höheren Harmonischen ausgewertet werden und zur Charakterisierung der enthaltenen Nanopartikel dienen.<sup>[182]</sup>

### 7.3 Synthese und Charakterisierung der Eisenoxid-Nanopartikel

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Synthese von magnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln (FeNP) die Methode der Präzipitation gewählt. Hierzu wurden Eisen(II) und Eisen(III)chlorid im molaren Verhältnis von 1,0 : 1,7 mit wässriger Ammoniaklösung (25 %Vol) versetzt, wodurch Magnetit ausfällt (vergleiche 7.1.2, Abb. 7.7).



Abb. 7.7: Synthese der magnetischen Eisenoxid-Nanopartikeldispersionen.

Dieser Reaktionsansatz wurde für einen optimalen Nucleationsprozess für 20 min bei 70 °C gerührt. War die Lösung wieder auf Raumtemperatur abgekühlt, wurde nach Ultraschallbehandlung das entstandene Magnetit mit einem Magneten sedimentiert und die überstehende Lösung abgegossen. Nach mehreren Wasch- und Sedimentationschritten wurde der pH-Wert der Dispersion auf 2 eingestellt, wodurch eine Stabilisierung der magnetischen Partikel erreicht wurde.<sup>[183-185]</sup> Die Oxidation zu Maghemit wurde dadurch nicht unterbunden, war aber für die Anwendungsgebiete der Partikel in dieser Arbeit auch nicht nachteilig, da die magnetischen Eigenschaften erhalten bleiben. Optisch



erkennbar war die Oxidation durch eine Verfärbung der Dispersion von schwarz-metallic zu braun (siehe Abb. 7.7). Salazar und Mitarbeiter berichten, dass magnetische Eisenoxid-Nanopartikel, die durch Fällung mit Ammoniumbasen  $\text{NR}_4\text{OH}$  (R= Methyl, Ethyl, Propyl) synthetisiert bzw. stabilisiert wurden und kleiner als 20 nm sind generell eine nichtstöchiometrische Zusammensetzung aus Magnetit und Maghemit aufweisen. Partikel über dieser Größe klassifizierten sie als Core-shell-Strukturen mit Magnetitkern und oxidiert Hülle.<sup>[186]</sup>

Wie in den Abb. 7.8 (a-c) und Tabelle 7.4 gezeigt, sind die mit dieser Methode gebildeten Eisenoxid-Nanopartikel des Ferrofluids regelmäßig geformt und zeigen eine monodisperse bzw. diskrete Größenverteilung. Der Vergleich der einzelnen Ansätze (FeNP-1, -3 und -4) belegt die Reproduzierbarkeit der Methode.

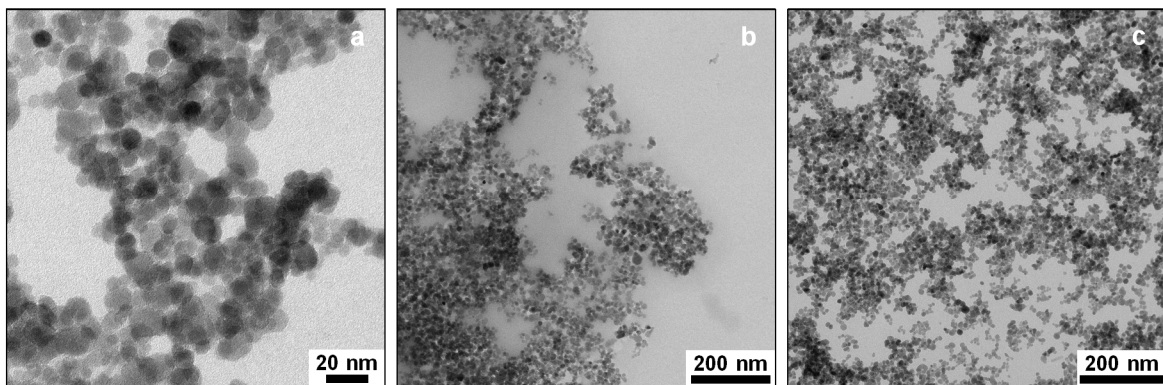


Abb. 7.8: TEM-Microrgraphen der Eisenoxid-Nanopartikeldispersionen von (a) FeNP-1, (b) FeNP-3 und (c) FeNP-4.

Die Eisenkonzentration wurde in den Dispersionen mittels Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES) analysiert und mittels Trockenmasse (TM) überprüft.

Tabelle 7.4: Charakterisierung der magnetischen Eisenoxid-Nanopartikeldispersionen.

Ansatz	Fe-Gehalt [%]			Durchmesser [nm]		
	pH <sup>a</sup>	TM	ICP-OES <sup>b</sup>	DLS <sup>c</sup>	MRX	TEM
<b>FeNP-1</b>	2,55	2,89	2,05	28	12,80	12,4±3,1
<b>FeNP-3</b>	2,10	3,93	3,72	27	8,73	12,2±2,6
<b>FeNP-4</b>	2,02	1,35	1,20	26	15,10	12,7±2,0
						11,1±2,5 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> pH-Einstellung nach Synthese, <sup>b</sup> Mittelwert aus 3 Bestimmungen,

<sup>c</sup> hydrodynamischer Durchmesser berechnet nach Volumenverteilung,

<sup>d</sup> Wiederholungsmessung ½ Jahr später.

Partikelgrößen und -verteilungen wurden durch DLS-Messungen, Magnetrelaxometrie-messungen (MRX) und durch statistische Bildverarbeitung der TEM-Aufnahmen bestimmt. Für die TEM-Messungen ist der durchschnittliche Durchmesser angegeben. Mittels Lichtstreuung wird immer der hydrodynamische Durchmesser bestimmt, weshalb die mit dieser Methode gemessenen Werte größer sind. Die aus den Magnetrelaxations-

messungen erhaltenen immobilisierten Relaxationskurven wurden mit dem Momenten-Superpositions-Modell<sup>[156]</sup> gefittet, wobei eine Sättigungsmagnetisierung von 480000 kA/M angenommen wurde. Die Anisotropiekonstante  $K$  wurde zu 7235,8 gefittet. Die Messungen wurden von Eric Heim und Aidin Lak im Institut für elektrische Messtechnik und Grundlagen der Elektrotechnik durchgeführt. Aus den Suzeptibilitätsmessungen kann der hydrodynamische Durchmesser bestimmt werden. Das Ergebnis der Kerngrößenverteilungen für die Eisenoxiddispersion FeNP-1 ist in Abb. 7.9 dargestellt und zeigt einen Hauptpartikeldurchmesser von 12,8 nm. Die durchschnittliche Größe der Partikel in den Eisenoxiddispersionen FeNP-3 und FeNP-4 beträgt 8,73 bzw. 15,1 nm. Die Auswertung der Suzeptibilitätsdaten zeigt weiterhin, dass die Partikel in den jeweiligen Dispersionen mit sehr gutem Unterschied der Relaxationssignale vorliegen und eine Agglomeration deshalb ausgeschlossen werden kann.

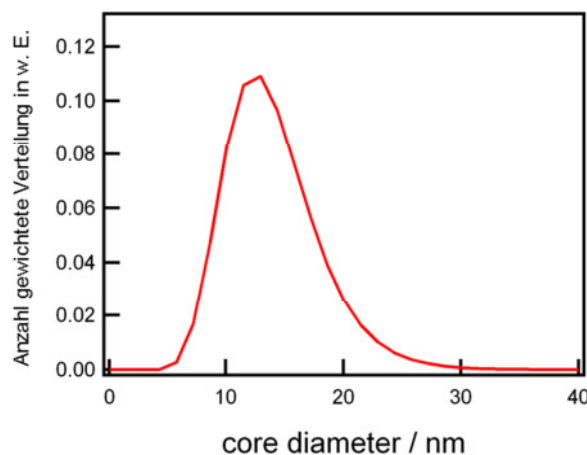


Abb. 7.9: Resultierende Größenverteilung von Dispersion FeNP-1 mittels Magnetrelaxometrie messung. Kerndurchmesser im Maximum 12,8 nm.

Die aus den TEM-Auswertungen und DLS-Messungen ermittelten Größen wurden bestätigt. Die Größenbestimmungen aus den TEM-Mikrographen und die Magnetrelaxationsmessungen ergaben gute Übereinstimmungen. Die erneute Aufnahme und Auswertung von TEM-Mikrographen von Dispersion FeNP-4 nach einem halben Jahr zeigte, dass die Partikel stabil sind. Die Größe ist gleich geblieben. Der Vergleich von Elektronenmikroskop-Bildern mit DLS-Messungen macht aber deutlich, dass immer mehrere Verfahren zur Größenbestimmung herangezogen werden müssen (Tabelle 7.4).

Die angewandte Präzipitationsmethode zur Synthese von magnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln ergibt Partikel mit einer engen Größenverteilung. Aggregations- oder Agglomerationsprozesse wurden durch die pH-Stabilisierung unterbunden. Wie wiederholte DLS-Messungen zeigten, sind die Dispersionen mehrere Monate ohne Präzipitation stabil. In den im Folgenden beschriebenen Beschichtungsversuchen wurde ausschließlich die Dispersion FeNP-3 eingesetzt.

## 7.4 Nanostrukturierung von modifizierten Polysacchariden

Für die Bildung von nanoskaligen Polymerpartikeln sind zwei Herstellungsarten bekannt. Die Polymerisation und die Dispersion der vorgeformten Polymere, die sich wiederum in den Aussalz-Prozess, die Emulsionsdiffusion und die Nanopräzipitation gliedern lässt.<sup>[187]</sup> In dieser Arbeit wird in Anlehnung an die Nanopräzipitation ein Self-assembly-Prozess der in den Kapiteln 4 bis 6 beschriebenen Glucanderivate, durch Lösungsmittelaustausch angestrebt. Beim Standardverfahren der Nanopräzipitation wird die organische Phase, in der ein Polymer gelöst ist, unter Rühren in eine wässrige Phase eingetropft. Das Polymer ist in Wasser nicht löslich und dadurch, dass das Lösungsmittel in die wässrige Phase diffundiert bilden sich Nanopartikel. Der Mechanismus kann in Wasser-Lösungsmittel, Wasser-Polymer und Lösungsmittel-Polymer Interaktion zerlegt werden.<sup>[187]</sup>

Die partielle Hydrophobisierung von Polysacchariden durch die Einführung nicht-polarer funktioneller Gruppen befähigt zur Nanostrukturierung durch Self-assembly. Als Self-assembly wird unter thermodynamischen Gesichtspunkten ein spontaner Prozess verstanden, der einem Gleichgewicht zustrebt. In der Chemie ist dies mit Minimierungsvorgängen verbunden und beschreibt einen Energieminimierungsprozess durch den gut definierte Strukturen gebildet werden und der nur durch die Größe, Zahl der Komponenten, Geometrie und die Stärke der Interaktionen zwischen den Komponenten bestimmt ist. Diese Strukturen werden durch nichtkovalente Wechselwirkungen gebildet und sind damit reversibel (d.h. die gebildete Struktur befindet sich im thermodynamischen Gleichgewicht mit ihren Komponenten). Die dynamischen Wechselwirkungen, die während eines Self-assembly-Prozesses auftreten, reflektieren die spezifischen Eigenschaften der Komponenten, die mit anderen Komponenten in gerichteter und spezifischer Weise wechselwirken, selbst aber nicht verändert werden. Triebkraft für die Selbstorganisationsprozesse ist eine höhere Energie der nichtassemblierten Komponenten im Vergleich zu niedrigeren Energie der geordneten, sich im statischen Gleichgewicht befindlichen Komponenten.<sup>[188]</sup>

Die Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe Heinze, insbesondere von Hornig et al. zeigen, dass ausreichend hydrophob modifizierte und somit amphiphile Glucanderivate in der Lage sind, sphärische Partikel im Nanometerbereich zu bilden, wenn eine Lösung des Polymers im polar aprotischen, (d.h. mit Wasser mischbaren Lösungsmittel) gegen das schlechtere Lösungsmittel Wasser dialysiert wird. Aufgrund von amphiphilen Wechselwirkungen kommt es zur Orientierung der hydrophoben Bereiche nach innen, während die hydrophilen Molekülteile nach außen hin orientiert sind. Dieser Vorgang ist vergleichbar mit der Micellenbildung von Tensiden. Es entstehen sogenannte Hydrogelnanopartikel.<sup>[43,189-191]</sup>

Bei der Untersuchung des Einflusses der physikochemischen Eigenschaften von wässrigen und organischen Phasen auf die Nanopartikelbildung bei der Nanofällungsmethode (Lösungsmittelaustausch) wurden von Galindo-Rodriguez et. al. Polyvinylalkohol und Methacrylsäure-Copolymer als Modellsustanzen eingesetzt. Grundlegende Reaktionen zu physikochemischen Phänomenen und ihren quantitativen Effekten sollten verstanden werden. Die Auswirkung von Polymerkonzentration und Lösungsmittelart auf die Nanostrukturierung wurden untersucht. Die Erhöhung von 14,4 auf 32,4 mg/mL Polymer führte zu einem Anstieg der durchschnittlichen Partikelgröße von 98 auf 232 nm mit gleichzeitiger Erhöhung der Polydispersität. Zudem wurde eine kritische Konzentration, ab der die Polymere große amorphe Aggregate zusätzlich zu den Nanopartikeln bilden, gefunden. Dafür wurden zwei Erklärungen vorgeschlagen: Je mehr Polymer, desto mehr Polymer-Polymer-Wechselwirkungen gibt es und je höher die Polymerkonzentration, desto viskoser wird das System und ein umso höherer Massentransferwiderstand liegt vor. Dieser Effekt erschwert die Diffusionsvorgänge. Zudem konnte ein klarer Trend bei der Untersuchung des Einflusses der Lösungsmittelart gefunden werden. Je kleiner der Unterschied der Löslichkeitsparameter ( $\Delta\delta$ ) zwischen den verwendeten Lösungsmitteln ist, desto kleiner sind die resultierenden Partikel.<sup>[187]</sup> In Abb. 7.10 ist schematisch dargestellt, wie die Nanostrukturierung der derivatisierten Polysaccharide (Kapitel 4 bis 6) durch Self-assembly in dieser Arbeit durchgeführt wurde.

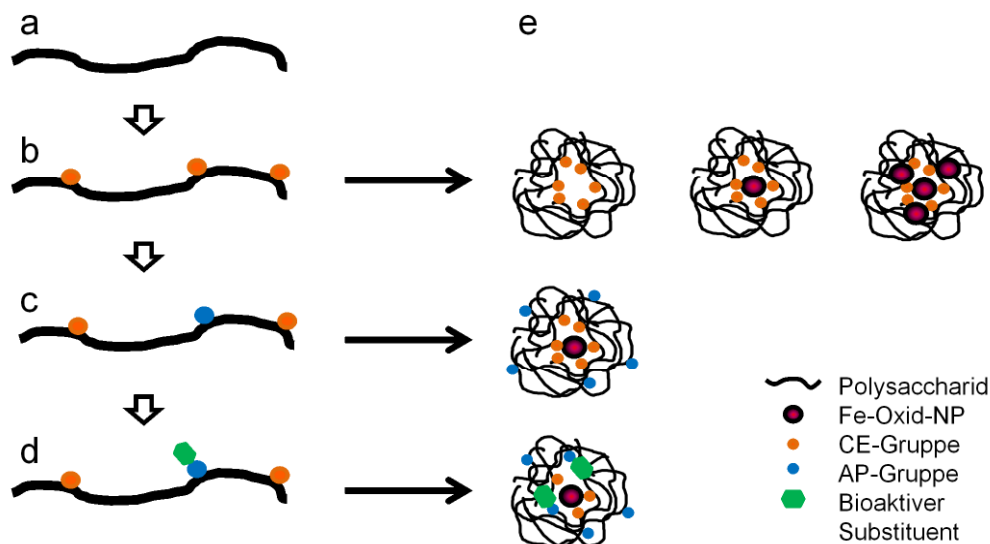


Abb. 7.10: Modelle zur Bildung von Hydrogelnanostrukturen aus modifizierten Glucanen durch Self-assembly (a) Polysaccharid (schwarz), (b) Cyanoethylglucan (CN-Gruppen: orange), (c) Aminopropylcyanoethylglucan (Aminogruppen: blau), (d) Aminopropylcyanoethylglucan mit funktionalisierten Aminogruppen (Kopplung von Aldehyden: grün, mittels reduktiver Aminierung), (e) Polysaccharid-Nanostrukturen ohne oder mit Eisenoxidkern (rosa) bzw. als Multicore-Partikel.

Durch die Einbettung von magnetischen Eisenoxidkernen können die Polysaccharidpartikel zusätzlich durch magnetische Felder kontrolliert werden. Anwendungen wie

gezielter Wirkstofftransport, magnetische Separationstechniken, Hyperthermieverfahren oder magnetische Bildgebungsverfahren sowie der Einsatz als Biosensoren sind denkbar.<sup>[14,95,165,192]</sup>

### 7.4.1 Nanostrukturierung von Cyanoethylglucanen

Zunächst wurde die Fähigkeit von Cyanoethyldextran (6 kDa) und Cyanoethylpullulan (100 kDa) zur Bildung von Nanopartikeln untersucht. Hierzu wurden die entsprechenden Polysaccharide in DMSO gelöst und entweder mit oder ohne Eisenoxid-Nanopartikelzusatz dialysiert. Bei diesem Vorgang erfolgt ein Austausch von DMSO als gutem Lösungsmittel gegen Wasser, in dem die höher substituierten Derivate nicht löslich sind. Aufgrund der zunehmenden Hydrophilie der Umgebung während dieses Prozesses, wird angenommen, dass sich die hydrophoben Cyanoethylgruppen zusammenziehen und sich micellenartigen Nanostrukturen organisieren (vergleiche Abb. 7.10).<sup>[43,190,191,193]</sup>

Der hydrodynamische Durchmesser und die Partikelgrößen werden mittels DLS-Messungen (Berechnung nach Volumenverteilung) bestimmt. Zusätzlich wurden Elektronenmikroskop-Bilder aufgenommen um u.a. die Morphologie beurteilen zu können und eine zusätzliche Methode zur Größenbestimmung zu haben.

Es wurde zunächst untersucht, wie der Substitutionsgrad die Nanostrukturierung beeinflusst. Als erstes Ergebnis kann festgestellt werden, dass nur Cyanoethylglucane mit einem DS-Wert  $> 2$  reguläre Partikel bilden. Diese sind über mehrere Wochen in Wasser ohne Präzipitation stabil.

Arbeiten zur Nanostrukturierung von Furoyl- und Pyroglutamyl-dextranen die weiter mit Propyl- oder Acetylgruppen modifiziert wurden, zeigen, dass auch bei diesen Derivaten zur Einstellung des Amphiphilen-Gleichgewichtes ebenfalls ein Gesamtsubstitutionsgrad  $> 2$  notwendig war. Es entstanden Partikel im Bereich von 90 bis 250 nm. Die Anwesenheit der polaren Carbonylfunktion und weniger polaren Einheiten im Polysaccharid wurde als notwendig für die Fähigkeit zum Self-assembly angesehen. Die Korrelation zwischen der molekularen Masse des eingesetzten Polysaccharids und der resultierenden Partikelgröße war schwer möglich, da bereits kleine Unterschiede in den DS-Werten die Größe der Nanopartikel beeinflussen. Als Ergebnis der Untersuchungen wurde festgestellt, dass die resultierende Partikelgröße vom Verhältnis der eingeführten funktionellen Gruppen abhängig sei, wobei aber keine Trends diskutiert wurden.<sup>[189]</sup>

Bei Cyanoethylderivaten mit DS-Wert  $< 2$  bildeten sich makroskopisch sichtbare, schlierenartige Schwebeteilchen. DLS-Messungen dieser Dispersionen ergaben, sofern überhaupt möglich, mehrere Größenverteilungen, wobei die „Teilchen“ auch mehr als 5000 nm groß waren. Der Fokus wurde daher auf die Bildung von nanoskaligen

Strukturen aus hochsubstituierten Cyanoethylpolysacchariden gelegt, wobei als erstes das Verhalten von einem hochsubstituierten Pullulan (CEP-17,  $DS_{CE} = 2,42$ , Kapitel 4) untersucht wurde. Die Einwaage des Polysaccharids wurde mit 20 mg konstant gehalten und der Zusatz an Eisenoxid wurde variiert (siehe Tabelle 7.5).

*Tabelle 7.5: Parameter und Charakterisierung der aus CEP-17 ( $DS_{CE} = 2,42$ ) ohne und mit steigender Menge ferromagnetischer Nanopartikel (FeNP-3) synthetisierten Polysaccharid-Nanstrukturen aus 20 mg Cyanoethylpullulan (= 0,07 mmol Glucosyleinheiten bzw. 0,165 mmol CE).*

Ansatz	FeNP Dispersion		Durchmesser <sup>a</sup> [nm]		
	$\mu\text{L}$	Fe [mmol]	DLS	Pdl	SEM
<b>101130 A</b>	-	-	241	0,054	260 $\pm$ 57
<b>100907 B</b>	10	0,0067	611	0,141	613 $\pm$ 174
<b>100907 A</b>	20	0,0133	399	0,107	388 $\pm$ 93

<sup>a</sup> hydrodynamischer Durchmesser berechnet über Volumenverteilung.

Bei allen Versuchen entstanden nanoskalige Strukturen ( $d = 241 - 611 \text{ nm}$ ) mit diskreten Größenverteilungen (Tabelle 7.5). Die kleinsten Partikel resultierten ohne den Zusatz von Eisenoxid-Nanopartikeln (101130 A).

Mit 20  $\mu\text{L}$  Fe-NP-3 (entsprechend 0,0067 - 0,0133 mmol Fe/0,07 mmol pro Glucoseeinheit, bzw. 0,165 mmol CE) wurden Strukturen mit einem Durchmesser von 399 nm gebildet. In Abb. 7.11 ist dargestellt, wie die mit Polysacchariden beschichteten Eisenoxid-Nanopartikel sich unter Einfluss eines Magnetfeldes verhalten.



*Abb. 7.11: Ferromagnetische Nanopartikel mit Polysaccharid-Beschichtung unter Einwirkung eines Magnetfeldes; Probe (100907-B).*

Die nächsten Versuchsreihen wurden mit einem hochsubstituierten Cyanoethyldextran (CED-6,  $DS_{GC} = 2,40$ ) durchgeführt, wobei größere Konzentrationen der Eisenoxid-Nanopartikel zugesetzt wurden. Wie in Tabelle 7.6 gezeigt entstanden auch hier nanoskalige Strukturen (203 - 444 nm).

*Tabelle 7.6: Parameter und Charakterisierung der aus CED-6 ( $DS_{GC} = 2,40$ ,  $20\text{ mg} = 0,07\text{ mmol}$  Glucosyleinheiten bzw.  $0,165\text{ mmol CE}$ ) ohne und mit steigender Menge ferromagnetischer Nanopartikel (FeNP-3) synthetisierten Polysaccharid-Nanostrukturen.*

Ansatz	FeNP Dispersion		Durchmesser [nm]		
	$\mu\text{L}$	Fe [mmol]	SEM	DLS <sup>a</sup>	PdI
<b>101130 B</b>	-	-	331±71	203	0,241
<b>100907-D</b>	10	0,0067	514±205	337	0,142
<b>100907-C</b>	20	0,0133	451±113	444	0,059
<b>120130-B</b>	20	0,0133	-	374	0,118
<b>110809 B</b>	20	0,0133	492±155	418	0,120
<b>111031 B</b>	200	0,1332	-	252	0,528
<b>111031 C</b>	300	0,1998	-	<sup>b</sup>	-
<b>111031 D</b>	400	0,2664	-	<sup>b</sup>	-
<b>111031 E</b>	500	0,3330	-	<sup>b</sup>	-
<b>110308</b>	500	0,3330	-	<sup>b</sup>	-

<sup>a</sup> hydrodynam. Durchmesser berechnet über Volumenverteilung, <sup>b</sup> aufgrund zu hoher Polydispersität nicht messbar.

Es zeigte sich, dass auch bei diesen Ansätzen ohne Zusatz der Eisenoxid-Nanopartikel-dispersion relativ kleine Partikel ( $d = 203\text{ nm}$ ) entstehen. Bei einer Menge von 10 bis  $20\text{ }\mu\text{L}$  FeNP-Dispersion (100907-C, 110809-B und 120130-B Tabelle 7.6) ergeben sich nanoskaligen Strukturen im gleichen Größenbereich ( $d = 374 - 444\text{ nm}$ ) mit geringeren Polydispersitätswerten. Die Erhöhung der Ferrofluidzugabe auf  $200\text{ }\mu\text{L}$  (entsprechend  $0,133\text{ mmol Fe}/0,07\text{ mmol Glucose}$ , bzw.  $0,165\text{ mmol CE}$ ) führte zu kleineren Partikeln ( $d = 252\text{ nm}$ ) mit höherer Polydispersität. Wurden bei einem DS-Wert von 2,40 mehr als  $200\text{ }\mu\text{L}$  FeNP-3 zugesetzt, so zeigen die DLS-Messungen eine polydisperse Partikelgrößenverteilung. Die Kapazität zur Aufnahme der  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Partikel war damit überschritten und schon während des Dialysevorgangs waren im Dialyseschlauch Aggregate und Niederschlagsbildung zu beobachten. Unter dieser Grenze wurden die zugesetzten Eisenoxidpartikel eingeschlossen. Mittels DLS-Messungen waren keine unbeschichteten Metalloxidpartikel mehr nachweisbar.

Beim Vergleich der einzelnen Methoden zur Größenbestimmung zeigt sich eine gute Übereinstimmung der DLS-Messungen mit der Auswertung der elektronenmikroskopischen Bilder. Letztere zeigten, dass es sich bei den Nanostrukturen aus den Cyanoethylpolysacchariden um reguläre, kugelige Gebilde handelt. Repräsentative SEM-Aufnahmen der polymeren Nanostrukturen sind in Abb. 7.12 dargestellt.

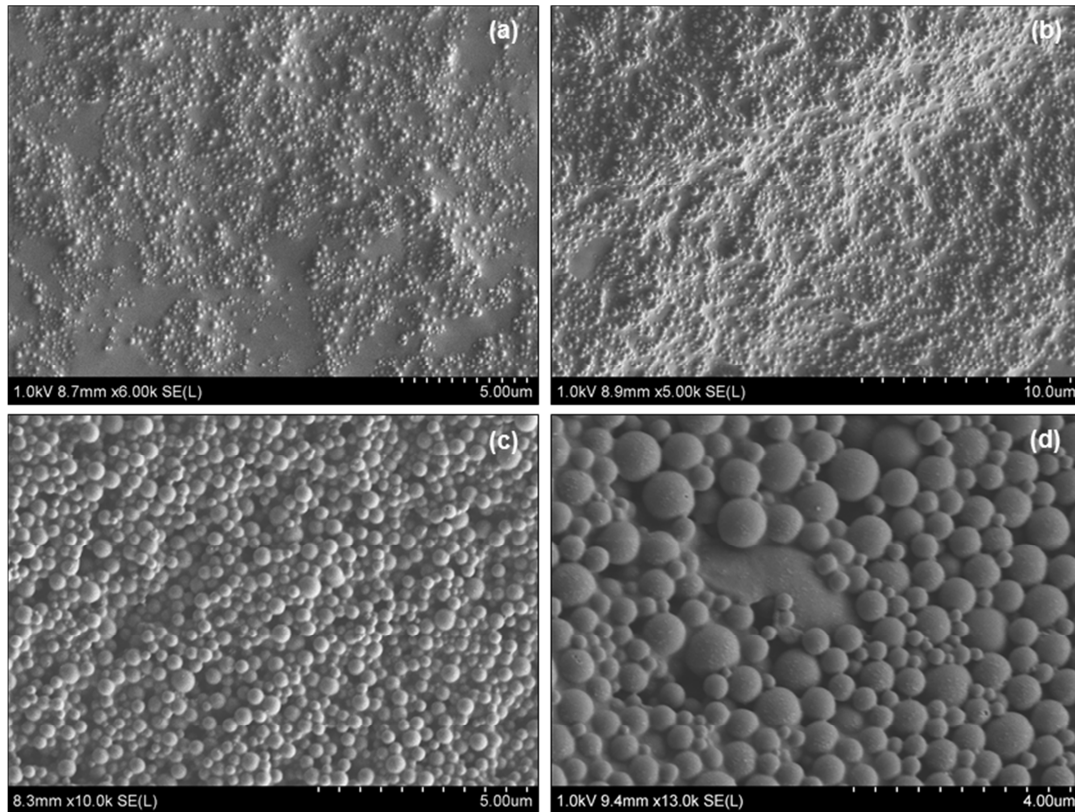


Abb. 7.12: SEM-Mikrographen von nanostrukturierten Polysacchariden ohne FeNP-Zusatz (a) 101130-A aus CEP-17 ( $DS_{CE} = 2,42$ ) und (b) 101130-B aus CED-6 ( $DS_{CE} = 2,40$ ) sowie von nanostrukturierten Polysacchariden mit FeNP-Zusatz (c) 100907-A aus CEP-17 ( $DS_{CE} = 2,42$ ) und (d) 100907-C aus CED-6 ( $DS_{CE} = 2,40$ ).

Die EF-TEM (Energy-filtered Transmission Electron Microscopy) ist eine geeignete Methode, um Struktur, Morphologie und vor allem den Redox-Zustand von metallhaltigen Nanopartikeln zu charakterisieren und damit auch ein geeignetes Mittel zur Analyse der Wechselwirkung von Cyanoethylpolysaccharid und Eisenoxid. Parallel Electron Energy Loss Spectroscopy-Analysen (PEELS) wurden mit den beschichteten und unbeschichteten Eisenoxid-Nanopartikeln durchgeführt, wobei die Energieverlustspektren von 690 - 740 eV summiert wurden. In Abb. 7.13 sind Spektren der Eisen  $L_{2,3}$ -Kanten der unbeschichteten Eisenpartikel (FeNP-3, rote Linie) im Vergleich zu den Polysaccharid-beschichteten (grüne Linie, Eintrag 100907-D Tabelle 7.5) und einem Eisenreferenzspektrum (schwarze gestrichelte Linie) gezeigt.<sup>[177]</sup> Die Intensität ist mit ca. 1000 Digits relativ niedrig (Abb. 7.13 c). Dies ist der Partikelgröße zuzuschreiben, welche die ideal-messbare Schichtdicke von 30 - 40 nm für EELS-Messungen deutlich überschreitet. Trotzdem kann ein charakteristisches Intensitätsprofil der Fe  $L_{2,3}$ -Kante mit einer energetischen Auflösung von 1,2 eV detektiert werden. Der Abstand der  $L_3$ - $L_2$ -Peakmaxima ist als Spin Orbit Splitting für die sogenannten "White line Elements" wie Übergangsmetalle und Lanthanoide definiert. Das Verhältnis von  $L_3/L_2$  ist ein Indikator für den Oxidationszustand des Elements. Die unbeschichteten Metalloxidpartikel zeigen Maxima von 708,2 eV und 720,7 eV für die  $L_3$ - bzw.  $L_2$ -Kante. Im Fall der beschichteten Partikel werden diese



Maxima bei 711,4 eV für die  $L_{3-}$  und 728,9 eV für die  $L_{2-}$ Kante mit einer signifikanten chemischen Verschiebung und Unterschieden im Spin Orbit Splitting gefunden. Lag letzteres für die unbeschichteten Partikel bei 12,5 eV, so wurde nach dem Coating ein  $\Delta$  von 17,5 eV festgestellt.

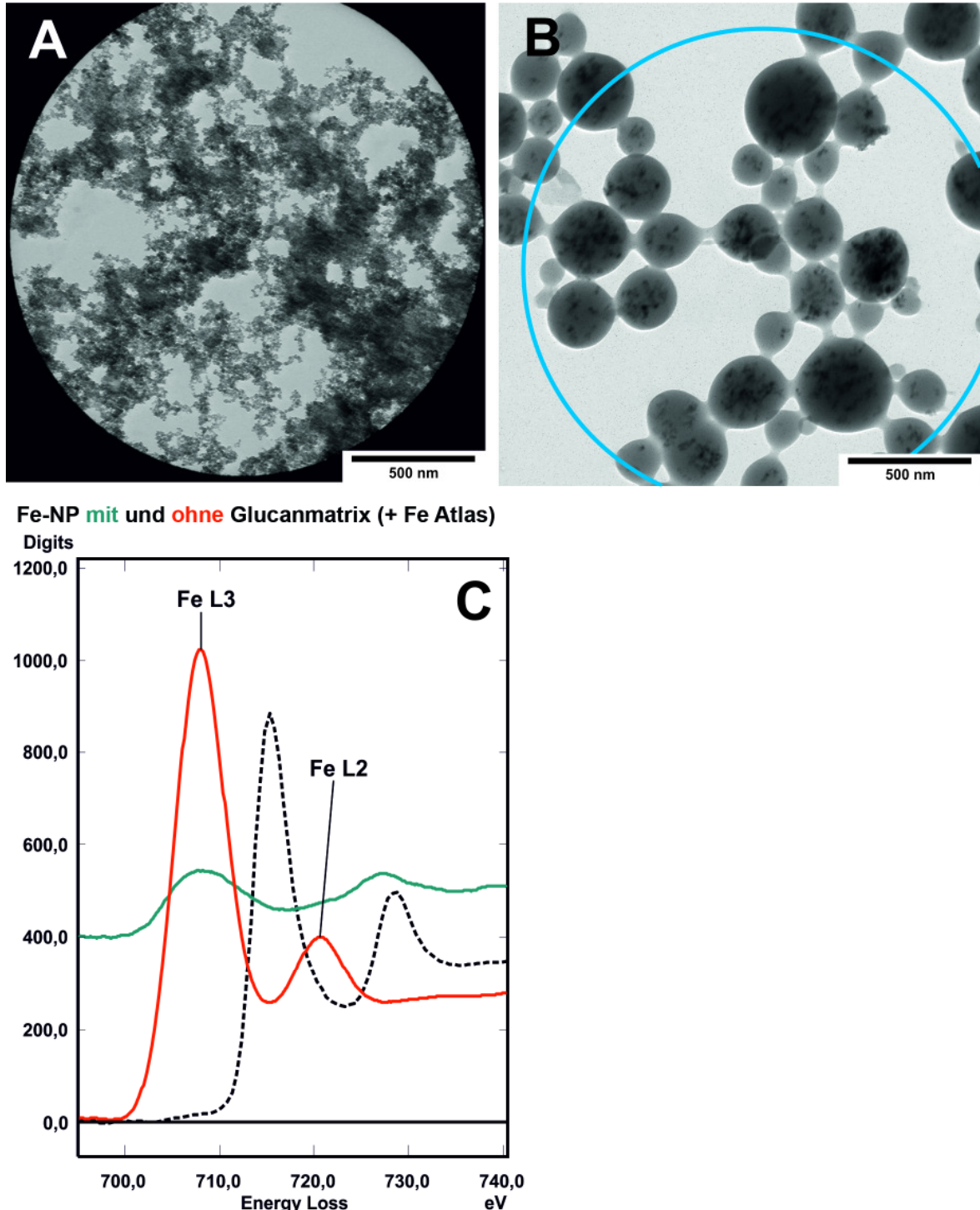


Abb. 7.13: TEM-Aufnahmen von (a) unbeschichteten Eisenoxid-Nanopartikeln, (b) von 100907-B: Cyanoethylpullulan beschichtete Eisenoxid-Multikern-Partikel, (c) PEELS Messungen von unbeschichteten Eisenoxid-Nanopartikeln (rote Linie), Polysaccharid-beschichteten Partikeln (grüne Linie) sowie dem Atlas-Reference Spektrum für FeO (schwarze, gestrichelte Linie), PEELS Messbereich ist als Apertur in (a) und als umkreister Bereich in (b) dargestellt.

In der Literatur ist die Möglichkeit zur Charakterisierung von 3d-Metallen über die Spektren der L-Kanten beschrieben. Durch den Vergleich der dort gegebenen Daten mit den vorliegenden Messungen kann gezeigt werden, dass Eisen in den Oxidationsstufen +2 und +3 vorliegt. Das Spin Orbit Splitting spiegelt den Einfluss des elektronischen Zustandes der Eisenoxidkerne wider. Die festgestellten Abweichungen lassen auf eine Interaktion der Nitrilgruppen mit den Cyanoethylgruppen schließen, die dann eine Beeinflussung der Elektronenzustände des Eisenoxids nach sich zieht.<sup>[176,194-196]</sup>

Die Einbettung der Eisenoxidkerne während des Dialyseprozesses ist zum einen durch das Fehlen von freien Metallpartikeln in den DLS-Messungen und zum anderen durch die Aufnahmen der transmissionselektronenmikroskopischen Messungen bewiesen. In Abb. 7.14 ist die Netto-Eisenverteilung (rot gekennzeichnet) in den Multi-core-Partikeln im Detail zu erkennen.

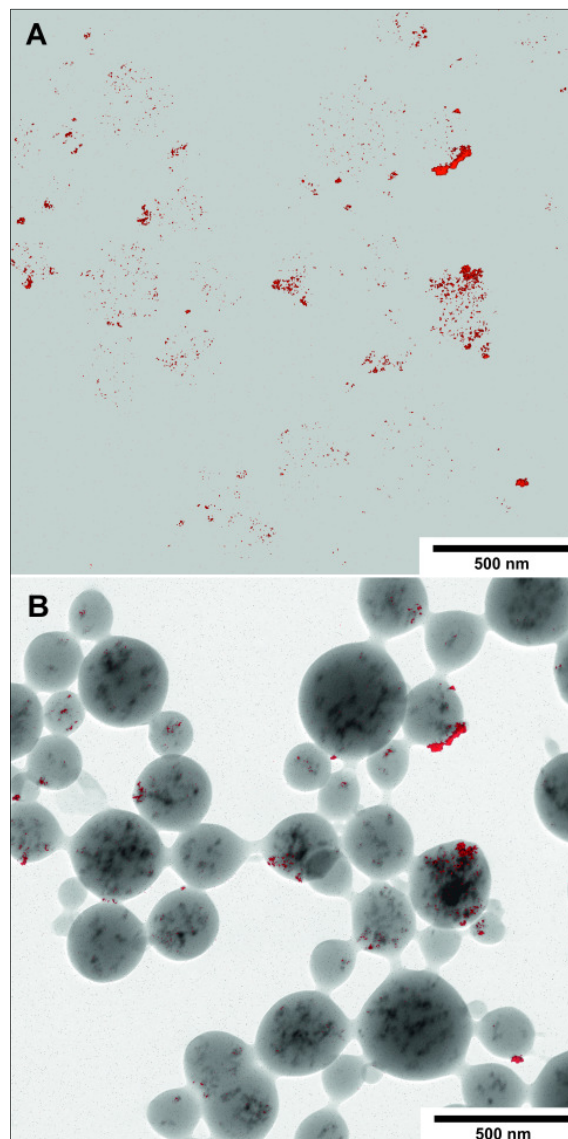


Abb. 7.14: (a) ESI Fe-Verteilungskarte von 100907-B (CEP-17,  $DS = 2,42$ ,  $10 \mu\text{L FeNP-3}$ ), Netto Eisenverteilung (rot), Intensitätsverlust des Signals bedingt durch Materialdicke, (b) Fe-Map über zero-loss (Nullelektronenverlust) Bild gelegt.

Aufgrund der Materialdicke, die für EELS-Messungen idealerweise nur bei 30 - 40 nm liegen sollte, zeigen die Eisenoxidpartikel nahe der Oberfläche die intensivsten Signale. Es können keine unbeschichteten Metalloxidnanopartikel auf der Carbonfolie des EM-Gitters oder im Waschwasser der Dialyse nachgewiesen werden. Dies sind zusätzliche Beweise für eine spezifische Wechselwirkung des „Eisens“ mit den Cyanoethylgruppen. Die hydrophoben Cyanoethylsubstituenten sollten nach innen gerichtet sein. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass abhängig von der Verteilung dieser Reste einige auch noch an der Partikelaußenseite zur wässrigen Phase ausgerichtet sind und somit eine Bindung von Eisenoxidpartikeln an der Außenseite verursachen.

Als Ergebnis der durchgeführten Versuche und Analysen konnte gezeigt werden, dass die magnetischen Eisenoxid-Nanopartikel durch den Self-assembly-Prozess hochsubstituierter Glucane in die Polysaccharidmatrix eingeschlossen werden. Zudem konnte eine spezifische Wechselwirkung mit den Cyanoethylgruppen mittels PEELS nachgewiesen werden.

Das Entkopplern der Synthese von  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Nanopartikeln und der Beschichtung mit Polymermaterialien hat im vorliegenden Fall den Vorteil, dass nur geringe Mengen der modifizierten Polysaccharide (um 20 mg) eingesetzt werden müssen. Copräzipitationsmethoden, bei denen die magnetischen Partikel simultan gebildet und beschichtet werden, erfordern zumeist einem größeren Versuchsansatz und benötigen folglich auch höhere Mengen Glucan.<sup>[197]</sup> Die sogenannte „Tropfmethode“ (Nanopräzipitation) hat zudem noch den Nachteil, dass irregulär geformte Partikel entstehen können, wie Hornig anhand der Bildung aus Celluloseacetaten ( $\text{DS}_{\text{Ac}} = 2,46$ ) zeigte. Während bei der Dialysemethode sphärische reguläre Partikel mit einem Hauptdurchmesser von 181 nm entstehen, resultierten bei dem Tropfverfahren unregelmäßig geformte, z.T. bohnenförmige Partikel.<sup>[191]</sup>

Die magnetischen Eigenschaften von beschichteten Eisenoxid-Nanopartikeln sind von der Eisenmenge abhängig und können innerhalb des oben aufgezeigten Rahmens variiert werden. Die Nanostrukturierung von Cyanoethyl-dextranen und -pullulanen zeigte keine signifikanten Größenunterschiede, obwohl es sich im ersten Fall um ein verzweigtes Polymer mit 6 kDa und bei Pullulan um ein lineares, 100 kDa großes Makromolekül handelt. Bei Untersuchungen von Hornig et al. zum Einfluss der molaren Masse von verschiedenen Celluloseacetaten auf die resultierende Partikelgröße bei Nanostrukturierung mittels Self-assembly wurden ebenfalls keine Anhängigkeiten festgestellt. Die Nanopartikel aus hydrolysierten Celluloseacetat mit molaren Massen von 26.100 und 51.100 g/mol ( $\text{DS}_{\text{CA}}$  von 1,65 bzw. 1,88) ergaben Partikel mit einem Hauptdurchmesser von 177 bzw. 166 nm und unterschieden sich damit nur unwesentlich vom ursprünglichen Polymer (131.600 g/mol,  $\text{DS}_{\text{CA}} = 2,46$ ), welches 181 nm große Partikel ergab.<sup>[190]</sup>

In einer anderen Arbeit wurden Furoyl-pyroglutamyl-dextrane mit unterschiedlichen Molekulargewichten untersucht ( $M_w$  5.430 - 54.800 g/mol). Das kleinere Dextran (5.430 g/mol) mit einem DS-Wert von 0,79 für die Substitution mit Furoat und 1,27 für die Pyroglutamatgruppen bildete Nanopartikel mit 513 nm (bzw. 448 nm nach Perpropionylierung). Bei den größeren Dextranderivaten (54.800 g/mol) mit DS-Werten von 0,22 und 1,34 für Furoat- bzw. Pyroglutamat war die Nanostrukturierung erst nach Perpropionylierung (250 nm) möglich. Die Größe des Ausgangspolysaccharids wurde als nicht entscheidend für den resultierenden Durchmesser der Partikel angesehen. Als Haupteinflussparameter auf die Partikelgröße wurde der DS-Wert, bzw. das amphiphile Gleichgewicht diskutiert. Bei der Nanostrukturierung von Furoyl-pyroglutamyl-dextran konnte der Trend abgeleitet werden, dass je hydrophober das Dextranderivat ist, desto kleinere Partikel entstehen.<sup>[44]</sup> Bei der Modifizierung von Dextran mit Ibuprofen zeigte sich ein umgekehrtes Verhalten. Bei einem geringen Substitutionsgrad ( $DS_{ibu} = 0,50$ ) entstanden Partikel mit einem Durchmesser von 102 nm. Aus hochsubstituierten Derivaten ( $DS_{ibu} = 2,08$ ) wurden Nanostrukturen mit einem Durchmesser von 287 nm erhalten.<sup>[198]</sup> Damit ist die resultierende Größe der Partikel nicht nur vom Substitutionsgrad sondern auch von der Art (Größe, Polarität) und den Wechselwirkungen der Substituenten abhängig. Die Bildung von Nanostrukturen aus Pentinyldextranen und ihren Kopplungsprodukten mit Biotin war ebenfalls möglich.<sup>[117]</sup> Bei Nanostrukturierung von Pentinyl- und Hexinyldextranen entstanden unterschiedliche, gemischte Formen: Kugeln, lange zylindrische Strukturen mit einer Größe bis zu 1  $\mu$ m und laminare, blattartige Strukturen konnten mittels SEM-Messungen nachgewiesen werden. Aus der Dialyse von Pentinyldextranen ( $DS = 0,43$ ) gegen eine Silbernitratlösung gehen nach Reduktion mit Ameisensäure nanoskalige Polysaccharidstrukturen mit Silbereinschlüssen hervor.<sup>[117]</sup> Ein weiteres Beispiel, wie Polymere als formgebende Matrix dienen können, ist die Entstehung von wurmartigen Silbernanopartikeln mit Methylcellulose als Template.<sup>[199]</sup>

In den nächsten Kapiteln (7.4.2 und 7.4.3) werden nur noch modifizierte Dextrane auf ihre Eignung zur Bildung von Nanostrukturen diskutiert.

## 7.4.2 Nanostrukturierung von Aminopropyl-Cyanoethylglucanen

Im Folgenden wird die Eignung zur Bildung von Hydrogelnanopartikeln durch Self-assembly von teilreduzierten Cyanoethyl-dextranen mit unterschiedlichsten Aminopropyl- und Cyanoethylsubstitutionsgraden vorgestellt. Auch bei dieser Testreihe wurden Versuche mit Eisenoxid-Nanopartikelzusatz den Ansätzen ohne diesen Zusatz gegenübergestellt und der Einfluss von Metallkernen diskutiert (Tabelle 7.7). Zudem wurde die Dialyse vergleichend gegen ein leicht basisches Medium untersucht, um Aussagen über das Verhalten der Aminogruppen zu erhalten. Die hergestellten Aminopropyl-dextrane (Tabelle 5.1, 100 % reduziert) sind wasserlöslich. Bei der Dialyse gegen Wasser fand bei

diesen Derivaten kein Self-assembly statt. Auch mit Zusatz von Eisenoxid-Nanopartikeln konnten mittels DLS-Messungen keine Nanostrukturen nachgewiesen werden. Es entstanden lediglich Präzipitate von Eisen und Polysaccharid. Aus der Literatur ist bekannt, dass Aminopropylcellulose zur effektiven Bindung von Metallionen durch Komplexierung in der Säulenchromatographie eingesetzt werden kann.<sup>[125]</sup> Durch diese Wechselwirkung zwischen Aminogruppe und Eisen könnte die Präzipitatbildung während des Dialyseprozesses erklärt werden.

*Tabelle 7.7: Reaktionsbedingungen der Nanostrukturierung von Aminopropylcyanoethylglucanen (Einwaage 20 mg).*

Ansatz	PS <sup>a</sup>	DS <sub>CE</sub> DS <sub>AP</sub>		FeNP-3-Zusatz		DLS		
				[μL]	Fe [mmol]	[nm] <sup>b</sup>	Pdl	[%] <sup>c</sup>
101112 A	APP-5	0,60	0,34	-	-	5033	0,109	100
101112 B	APP-5	0,60	0,34	100	0,67	339	0,329	54
						55		46
101112 C	APP-5	0,60	0,34	500	3,35	84	0,264	26
						265		25
						4774		49
101112 D	APP-5	0,60	0,34	1000	6,70	22	0,262	23
						73		32
						276		45
110121 A	APP-3	0,71	0,20	-	-	4	0,381	11
						14		85
						382		1
110121 B	APP-3	0,71	0,20	500	3,35	129	0,106	100
110606 A	APD-29	2,32	0,13	-	-	390	0,328	24
						4604		76
110606 B	APD-29	2,32	0,13	500	3,35	367	0,313	35
						78		34
						5272		31
110808 C	APD-30	2,40	0,28	-	-	284	0,148	100
110808 D	APD-30	2,40	0,28	20	0,0133	248	0,104	100
120130-C	APD-32	0,85	0,63	-	-	271	0,460	36
						5511		64
120130-D	APD-32	0,85	0,63	20	0,0133	324	0,257	36
						5248		64
120130-E	APD-20	0,30	1,32	-	-	562	0,552	72
						152		28
120130-F	APD-20	0,30	1,32	20	0,0133	103	0,253	23
						233		28
						5241		49
120130-G	APD-6	0,84	0,09	-	-	406	0,634	100
120130-H	APD-6	0,84	0,09	20	0,0133	158	0,268	97
						5046		3
120416-C	APD-32	0,85	0,63	20	0,0133	75	0,344	84
						30		16
120416-D	APD-32	0,85	0,63	-	-	331	1,000	100

<sup>a</sup> vergleiche Tabelle 5.1 und 5.2, <sup>b</sup> hydrodynamischer Durchmesser berechnet über Volumenverteilung, <sup>c</sup> prozentualer Anteil am Gesamtvolumen.

In der Versuchsreihe 101112 A - D wurde der Einfluss einer steigenden Eisenoxid-Nanopartikelkonzentration von 0  $\mu\text{L}$  bis 1000  $\mu\text{L}$  (entsprechend bis 6,7 mmol Fe) bei der Beschichtung mit einem Aminopropylcyanoethylpullulan (APP-5,  $\text{DS}_{\text{AP}} = 0,34$  und  $\text{DS}_{\text{CE}} = 0,60$ ) untersucht. Deutlich zu erkennen ist, dass je mehr Eisenpartikel zugesetzt wurden, kleinere Partikeldurchmesser dominierten (A bis C). Bei einem Zusatz von 1000  $\mu\text{L}$  FeNP-3 liegt eine Fraktion mit  $d = 22 \text{ nm}$  (23 %) vor, bei der es sich um nicht eingebundene Eisenoxidpartikel handeln sollte. Das Aminopropylcyanoethylpullulan APP-3 mit  $\text{DS}_{\text{AP}} = 0,20$  und  $\text{DS}_{\text{CE}} = 0,71$  zeigte ohne Zusatz von Eisenpartikeln ebenfalls eine große Polydispersität. Bei Zusatz von 500  $\mu\text{L}$  FeNP-3 bildeten sich monodisperse Partikel ( $\text{Pdl} = 0,106$ ) mit einem Durchmesser von 129 nm. Bei diesem Pullulanderivat scheint die amphihile Balance optimal für die Bildung von nanostrukturierten Polysacchariden mit Eisenkernen zu sein.

Basierend auf den Erkenntnissen aus Kapitel 7.4.1 wurden hoch substituierte Cyanoethyl-dextrane mit einem geringen Anteil an Aminogruppen (APD-29  $\text{DS}_{\text{CE}} = 2,32$ ,  $\text{DS}_{\text{AP}} = 0,13$  und APD-30  $\text{DS}_{\text{CE}} = 2,40$ ,  $\text{DS}_{\text{AP}} = 0,28$ ) zur Dialyse eingesetzt. Es ergaben sich Größenfraktionen mit 390 und 4606 nm (24 % bzw. 76 %). Mit Eisenzusatz (500  $\mu\text{L}$ ) erhöhte sich der Anteil an Partikeln mit einem Durchmesser um 370 nm (35 %). Der Anteil an Strukturen  $> 5000 \text{ nm}$  wurde von 76 auf 31 % reduziert. Die Ergebnisse für APD-30 zeigten mit 284 nm (110808-C) und 248 nm (110808-D) mit FeNP-3-Zusatz (20  $\mu\text{L}$ ) eine monodisperse Größenverteilung. Bei dieser Versuchsreihe führte die Dialyse mit Eisenoxid-Nanopartikeln zu kleineren Partikeln. Eine Elektronenmikroskop-Aufnahme von Probe 110808 D ist in Abb. 7.15 dargestellt.

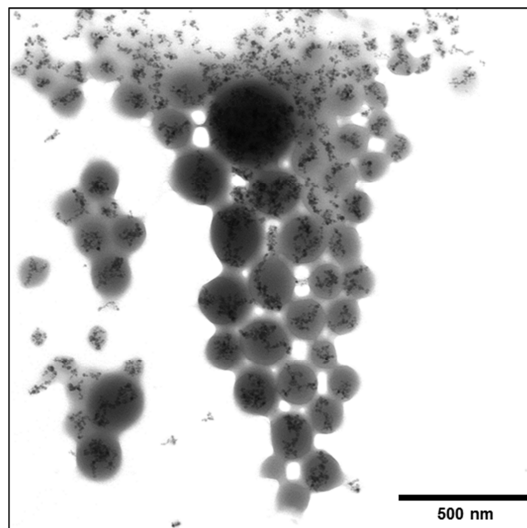


Abb. 7.15: Nanostrukturierte Aminopropyl-cyanoethyl-dextrane (110808-D) mit Eisenoxid-Nanopartikelkernen (20  $\mu\text{L}$  FeNP-3, entsprechend 0,0133 mmol Eisen).

Im wässrigen Milieu (pH 7) liegen Amine in geringem Ausmaß protoniert vor.<sup>[200]</sup> Es entstehen Ammonium- und Hydroxydionen. Dadurch wären die Aminogruppen beim

Dialyseprozess in Richtung der wässrigen Phase und nicht zum hydrophoben Partikelkern hin orientiert. Über einen Dialyse-Prozess gegen eine leicht basische Lösung (Natronlauge pH-Wert 9,25) sollte dieser Effekt untersucht werden. Die Aminoalkylgruppen wären nicht mehr protoniert und sollten sich ins Partikelinnere ausrichten und miteinander Wasserstoffbrücken ausbilden können. Es wurden die Aminopropyl-Cyanoethylderivate APD-32, APD-20 und APD-6 mit unterschiedlichen Cyanoethyl- bzw. Aminopropylsubstitutionsgraden getestet, sowohl ohne als auch mit Eisenzusatz (20  $\mu$ L) (Ansatz 120130-C-H Tabelle 7.7). Bei Versuchsansatz 120130-C und -D aus APD-32 (mit  $DS_{CE} = 0,85$  und  $DS_{AP} = 0,63$ , einem ähnlichen DS-Verhältnis wie bei APP-3) bildeten sich sowohl mit als auch ohne Eisenpartikelzusatz nanoskalige Strukturen mit einem Durchmesser von 324 bzw. 271 nm. Es gab jedoch auch einen Anteil (64 %) an Teilchen mit einer Größe von über 5000 nm. Bei Ansätzen mit einem hohen Aminopropylsubstitutionsgrad ( $DS_{AP} = 1,32$ ) und einem Cyanoethylierungsgrad von  $DS_{CE} = 0,30$  resultierten ohne Zusatz von FeNP-3 zwei Größenfraktionen mit 562 und 152 nm. Durch den Zusatz des Ferrofluids erfolgte keine Vereinheitlichung der Größe. War der Cyanoethylierungsgrad im Gegensatz zur Aminopropylsubstitution hoch 120130-G bis -H (APD-6,  $DS_{CE} = 0,84$  und  $DS_{AP} = 0,09$ ), so entstanden Partikel mit einer Größenverteilung von durchschnittlich 406 nm (ohne FeNP) bzw. 158 nm (mit FeNP-Zusatz). Die Hauptpartikelgröße verkleinerte sich durch den Eisenoxidpartikelzusatz, es waren aber auch wieder große Teilchen (5046 nm) mit einem Anteil von 3 % in der Dispersion vorhanden. Eine mögliche Erklärung kann hier die Bildung von netzartigen, großen Strukturen durch Wechselwirkung der Aminogruppen mit den Eisenoxidteilchen sein.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch die Dialyse gegen pH 9,25 eine engere Größenverteilung als bei der Dialyse gegen Wasser resultiert. Der Eisenzusatz bewirkte eine zusätzliche Fokussierung der Partikeldurchmesser. Dennoch sind die Polydispersitätswerte bei Nanostrukturen aus den Aminopropylcyanoethylglucanen relativ hoch und es lagen zumeist mehrere Größenfraktionen vor. In Arbeiten zur Nanostrukturierung von aminofunktionalisierter Cellulose wurden neben der Aminofunktion zusätzlich hydrophobe Einheiten (Phenylisocyanat) eingebracht, um ein für Self-assembly ausreichendes amphiphiles Gleichgewicht einzustellen.<sup>[201]</sup>

### 7.4.3 Nanopartikelbildung aus multifunktionalisierten Polysacchariden

In diesem Teil der Arbeit wird die Bildung von nanoskaligen Strukturen aus den mittels reduktiver Aminierung funktionalisierten Aminopropyldextranen diskutiert (vgl. Kapitel 6 Tabelle 6.1). In Tabelle 7.8 sind die Parameter für die jeweiligen Ansätze angegeben.

Tabelle 7.8: Reaktionsbedingungen der Nanostrukturierung von modifizierten Aminopropylglucanen (Einwaage 20 mg).

Ansatz	Edukte		DS <sub>CE</sub> <sup>b</sup>	DS <sub>AP</sub> <sup>b</sup>	DS <sub>Ald</sub> <sup>a</sup>	Fe-NP [μL]	DLS <sup>c</sup> [nm] <sup>c</sup>	[%] <sup>d</sup>	Pdl
	a	b							
<b>NP-Bn-4</b>	Bn-4	APD-32	0,85	0,63	0,66	-	99 5458	86 14	0,351
<b>NP-Bn-4-Fe</b>	Bn-4	APD-32	0,85	0,63	0,66	20	113 5272	59 41	0,256
<b>NP-Bn-5</b>	Bn-5	APD-33	0,91	0,49	0,45	-	95	100	0,259
<b>NP-Bn-5-Fe</b>	Bn-5	APD-33	0,91	0,49	0,45	20	129 5505	74 26	0,339
<b>NP-Bn-6</b>	Bn-6	APD-30	2,40	0,28	0,02	-	141	100	0,156
<b>NP-Bn-6-Fe</b>	Bn-6	APD-30	2,40	0,28	0,02	20	98 5360	92 8	0,176
<b>NP-Van-14</b>	Van-14	APD-32	0,85	0,63	0,48	-	372 75	59 41	0,832
<b>NP-Van-14-Fe</b>	Van-14	APD-32	0,85	0,63	0,48	20	96	100	0,121
<b>NP-Van-15</b>	Van-15	APD-33	0,91	0,49	0,45	-	511 121	79 21	0,602
<b>NP-Van-15-Fe</b>	Van-15	APD-33	0,91	0,49	0,45	20	122 5323	73 27	0,288
<b>NP-Van-16</b>	Van-16	APD-31	2,31	0,28	0,12	-	239	100	0,147
<b>NP-Van-16-Fe</b>	Van-16	APD-31	2,31	0,28	0,12	20	194	100	0,134
<b>NP-BHT-5</b>	BHT-5	APD-27	-	1,31	0,15	-	317 69 5469	71 10 19	0,341
<b>NP-BHT-5-Fe</b>	BHT-5	APD-27	-	1,31	0,15	20	90 234 5383	56 23 21	0,232
<b>NP-BHT-6</b>	BHT-6	APD-27	-	1,31	0,70	-	79 15	13 87	0,295
<b>NP-BHT-6-Fe</b>	BHT-6	APD-27	-	1,31	0,70	20	116 22 2446	3 71 26	0,382

<sup>a</sup> vergleiche Tabelle 6.1 und <sup>b</sup> 5.1, <sup>c</sup> hydrodynamischer Durchmesser berechnet über Volumenverteilung, <sup>d</sup> prozentualer Anteil am Gesamtvolumen.

Bei allen funktionalisierten Dextranen waren nach dem Dialyseprozess Strukturen im Nanobereich nachweisbar.

Aus den mit Benzaldehyd modifizierten Dextranen (Bn-6, Bn-4 und Bn-5) ergaben sich durch den Dialyseprozess nanoskalige Strukturen mit einem Durchmesser von 141, 99 bzw. 95 nm. Bei den mit Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Nanopartikeln versetzten Parallelansätzen lagen die Partikel mit 98, 113 und 129 nm in der gleichen Größenordnung, es gab aber auch Größenfraktionen > 5000 nm mit Anteilen (Volumen) von 14 bis 41 %.

Das Polysaccharid Van-16 mit einem DS<sub>Van</sub> von 0,12 sowie einem DS<sub>CE</sub> von 2,31 bildete mit und ohne Fe-Zusatz (20 μL) nanoskalige Strukturen mit einer diskreten Größenverteilung im Bereich von 239 nm bzw. 194 nm (vergleiche Tabelle 7.8). Der Zusatz von 20 μL



Eisennanopartikeldispersion bewirkte auch in diesem Versuchsansatz eine Verkleinerung (ca. 20 %). Die folgende TEM-Aufnahme von Van-16-Fe zeigt, wie auch in den Mikrographen der Cyanoethyl-dextrane, den Einschluss der Eisenoxid-Nanopartikel in die Polysaccharidmatrix. Freie Eisenkerne wurden auch hier nicht detektiert (siehe Abb. 7.16).

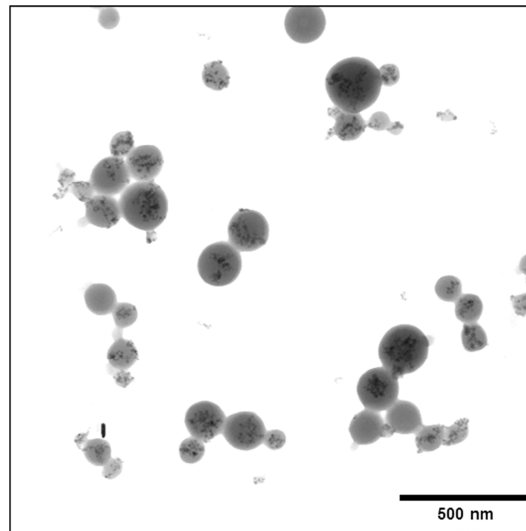


Abb. 7.16: TEM-Aufnahme von nanostrukturiertem N-(4-Hydroxy-3-methoxy)benzyl-aminopropyl-dextran mit Eisenoxidkernen (Tabelle 7.8, Van-16-Fe).

Wurde das modifizierte Polysaccharid Van-14 mit einem  $DS_{\text{Van}}$  von 0,48 und einem geringeren  $DS_{\text{CE}}$  von 0,85 zur Nanostrukturierung eingesetzt, so entstanden auch nanoskalige Strukturen, jedoch lagen zwei Größenspezies mit 372 nm und 75 nm vor. Der Zusatz von 20  $\mu\text{L}$  Magnetitdispersion ergab in diesem Fall eine diskrete Größenverteilung mit durchschnittlich 96 nm großen Partikeln. Bei Van-15 mit einem  $DS_{\text{CE}}$  von 0,91 und  $DS_{\text{AP}} = 0,49$  und einem  $DS_{\text{Van}}$  von 0,45 werden durch den Dialyseprozess nur Nanostrukturen in zwei Größenordnungen ( $d = 511$  nm und 121 nm) erhalten. Durch den Zusatz von Eisen resultierten Partikel mit einer durchschnittlichen Größe von 122 nm (73 %). Der Zusatz von Eisenkernen war hier offensichtlich wieder förderlich für einen kleineren Durchmesser. Mit BHT funktionalisierte Polysaccharide (BHT-5 und BHT-6) zeigten ebenfalls Self-assembly und bildeten nanoskaligen Strukturen. Bereits ab einem  $DS_{\text{BHT}}$ -Wert von 0,15 und ohne verbliebene Cyanoethylgruppen lagen Partikel mit 317 nm (71 %) vor. Im Parallelansatz mit 20  $\mu\text{L}$  Eisenoxiddispersion sind die resultierenden Partikel mit 90 bis 243 nm (23 %) kleiner. In beiden Fällen sind Partikel  $< 5000$  nm nachweisbar (20 %). Der Versuchsansatz BHT-6 mit einem  $DS_{\text{BHT}}$  von 0,70 (aus APD-27 mit  $DS_{\text{AP}} = 1,31$ ) zeigte auch eine polydisperse Größenverteilung. In den TEM-Aufnahmen (Abb. 7.17) sind Partikel mit einem Durchmesser um 80 nm erkennbar. Im Vergleich zu den Cyanoethylderivaten ist wenig Eisen in die Polysaccharidhülle eingebunden. Es sind freie Eisenoxid-Nanopartikel in den Elektronenmikrographen sichtbar und mit DLS (22 nm, 71 %) detektierbar.

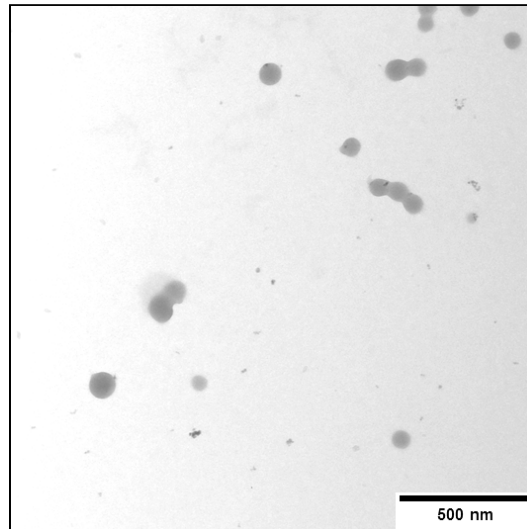


Abb. 7.17: TEM-Mikrograph von nanostrukturiertem N-3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxy-benzyl-amino-propyldextran mit Eisenoxidkernen (Tabelle 7.8, BHT-6-Fe).

Aus den mit Benzaldehyd, Vanillin und BHT funktionalisierten Polysacchariden können mit und ohne Eisenzusatz nanoskalige Strukturen durch Self-assembly in einem Dialyseprozess (DMSO gegen Wasser) gebildet werden. Die bei einigen Versuchsansätzen entstandenen Multi-Size-Fractionen, könnten durch geeignete Filtrationsprozesse, Zentrifugation oder asymmetrische Flussfeldfraktionierung in diskrete Größenverteilungen getrennt werden.

#### 7.4.4 Magnetpartikelspektroskopie

Zur Charakterisierung mittels Magnetpartikelspektroskopie wurden Polysaccharid-beschichtete Multicore-Nanopartikel eingesetzt. Die Messungen wurden am Institut für Elektrische Messtechnik und Grundlagen der Elektrotechnik der TU Braunschweig von Thilo Wawrzik und Hilke Remmer durchgeführt. Die Erstellung und Auswertung der Graphen erfolgte in Zusammenarbeit mit Thilo Wawrzik.

Die Glucanmatrix bestand bei den Proben 100907-A aus Cyanoethylpullulan ( $d = 399$  nm,  $DS_{CE} = 2,42$ , siehe Tabelle 7.5) und bei 120130-B aus Cyanoethyldextran ( $d = 374$  nm,  $DS_{CE} = 2,40$ , siehe Tabelle 7.6). Des Weiteren wurden Nanopartikeldispersionen eingesetzt, in denen das Polysaccharid mit Benzaldehyd, mit Vanillin und mit 3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxy-benzaldehyd funktionalisiert wurde (NP-Bn-4-Fe, NP-Bn-5-Fe, NP-Van-14-Fe, NP-Van-15-Fe, NP-BHT-5-Fe vergleiche Tabelle 7.8). Das Signalspektrum der Oberschwingungen der Proben ist in Abb. 7.18 dargestellt.

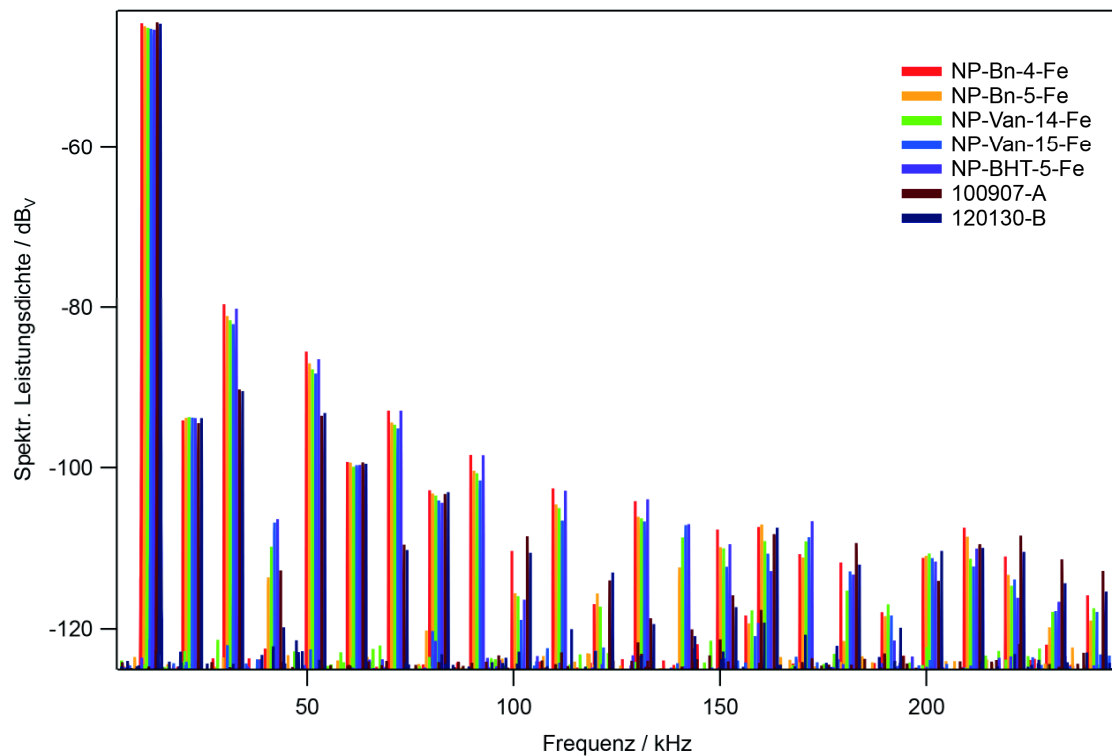


Abb. 7.18: Signalspektrum der Unharmonischen von Nanopartikeldispersionen NP-Bn-4-Fe, NP-Bn-5-Fe, NP-Van-14-Fe, NP-Van-15-Fe, NP-BHT-5-Fe, 100907-A und 120130-A.

Zum Vergleich wurde das kommerziell erhältliche MRI-Kontrastmittel Fera-Spin<sup>TM</sup> R gemessen und mit dem Spektrum der Partikel von Probe NP-Bn-4-Fe dargestellt (Abb. 7.19).

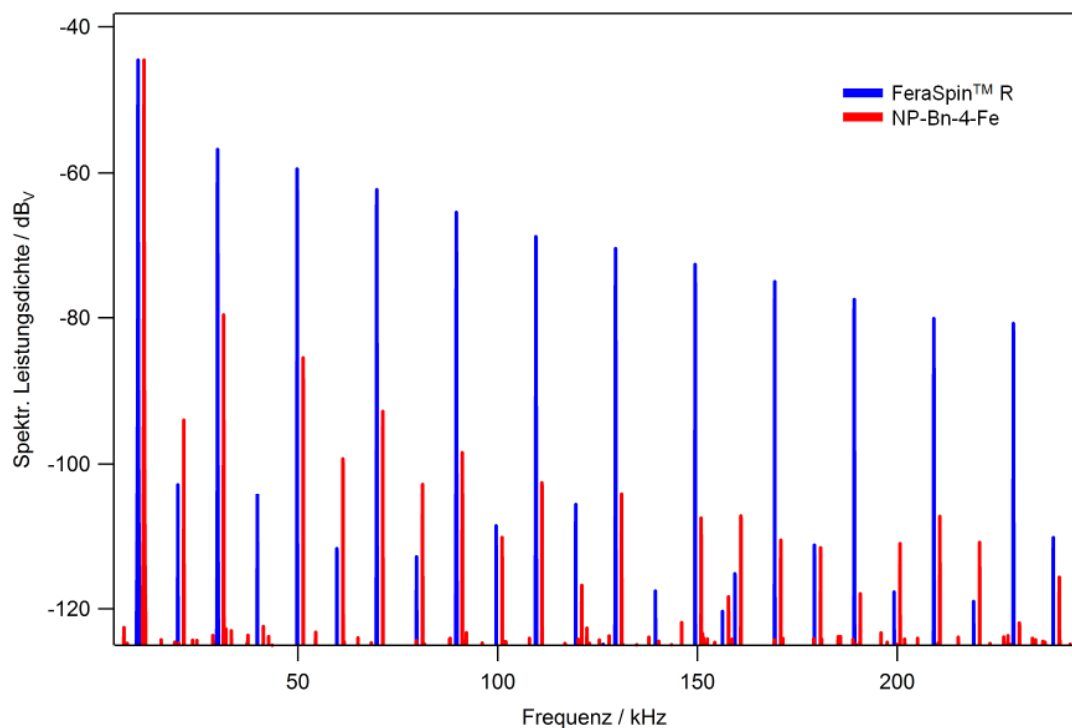


Abb. 7.19: Signalspektrum der Nanopartikeldispersion NP-Bn-4-Fe (rot) und Fera-Spin<sup>TM</sup> R (blau).

Die geometrischen Eigenschaften der Probe treten in der Magnetisierungsdynamik zum Vorschein. Der Abfall der Oberwellen im Spektrum erlaubt einige direkte qualitative Rückschlüsse auf die Probe. Ein steiler Abfall bedeutet, dass ein kleines magnetisches Moment und damit geringere Partikeldurchmesser vorliegen. Bei einem linearen Abfall ist von einer engen Größenverteilung der Partikel auszugehen. Multikern-Partikel zeigen ein reicheres Spektrum an höheren Harmonischen als Einzelkernpartikel. Je größer die Partikel sind, desto träger sind sie und umso langsamer reagieren sie auf das angelegte Feld. Für optimale MPS-Messungen sollten die effektiven magnetischen Momente möglichst groß sein, also ein flacher Abfall der Kurven vorliegen. Die Proben der Multikernpartikel mit funktionalisierter Glucanmatrix (NP-Bn-4-Fe, NP-Bn-5-Fe, NP-Van-14-Fe, NP-Van-15-Fe, NP-BHT-5-Fe) zeigen einen ähnlichen Verlauf in der Magnetisierungsdynamik. Abb. 7.20 zeigt den Abfall der ungeraden Harmonischen der Probe (über Index der Harmonischen). Die Abszisse kann entweder als Frequenz  $f$  (vgl. 7.18 und 7.19) oder als Index  $n$  der Harmonischen dargestellt werden ( $f = n f_0$ ).

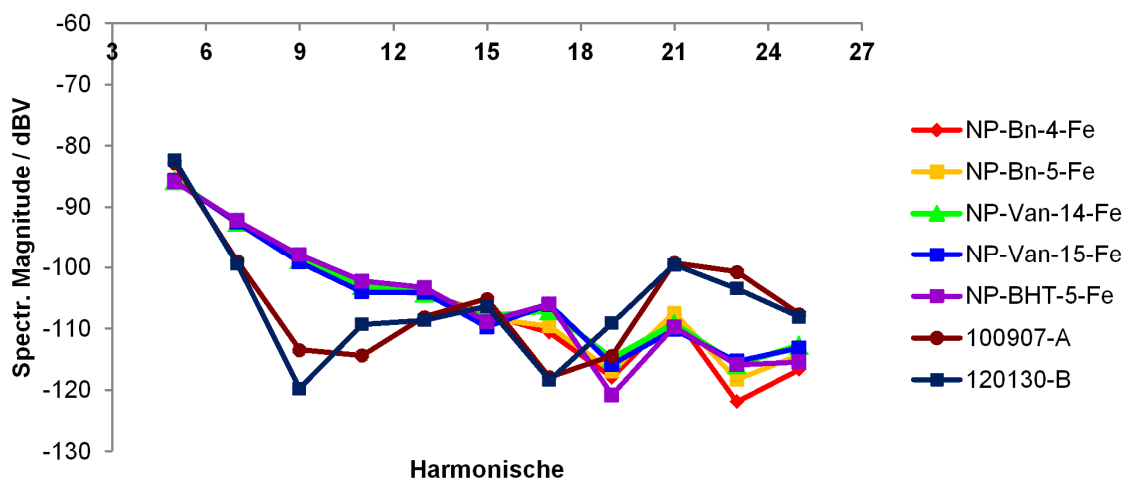


Abb. 7.20: Abfall der ungeraden Harmonischen.

Die Gründe für Unterschiede im Abfall der ungeraden Harmonischen können durch die Packung der Eisenkerne in der Matrix verursacht werden. Liegen sie nahe nebeneinander können sich die magnetischen Momente aufheben. Häufiger ist die gegenseitige Stabilisierung, sodass sie sich die einzelnen Partikel effektiv wie ein größeres Teilchen verhalten. Auch Oberflächeneffekte an den Eisenoxidpartikeln, wie Oxidationsvorgänge (Magnetit-Maghemit-Verhältnis) oder die Wechselwirkung mit dem Coating haben Einfluss. Ein Vergleich zu den Fera-Spin<sup>TM</sup> R Partikeln, die 10 - 90 nm groß sind und hydrodynamischen Hauptpartikeldurchmesser von 60 nm aufweisen, zeigt, dass die in dieser Arbeit hergestellten Partikel eine ähnliche Magnetisierungsdynamik aufweisen. Eine Anwendung als MRI-Kontrastmittel wäre möglich, es wäre jedoch von Vorteil, wenn die Partikel kleiner (um 100 nm) wären, da somit eine schnellere Ummagnetisierung begünstigt wird.

### 7.4.5 Markierung von Nanostrukturen mit Fluorescamine

Zusätzlich zu den mittels reduktiver Aminierung funktionalisierten Glucanen, die zur Nanopartikelbildung eingesetzt wurden, wurde eine Funktionalisierung der aminogruppenhaltigen Glucane mit Fluram<sup>®</sup> (Fluorescamine) nach Nanostrukturierung durchgeführt. Ziel war es eine weitere schnelle Derivatisierungsmethode zu entwickeln und Aussagen über die Anordnung und damit die Zugänglichkeit der Aminogruppen machen zu können. Ursprünglich diente die Markierung von primären Aminen mit Fluram<sup>®</sup> zur Analytik von Aminen und Aminosäuren in Wasser. Das Reagenz wurde entwickelt, um die Nachteile, die bei der Verwendung von Ninhydrin auftreten können (infolge hoher Reaktionstemperaturen und Bildung von Nebenprodukten) zu vermeiden. Fluram<sup>®</sup> ist ein 4-Phenylspiro[furan-2(3H),1'-phthalan]-3,3'-dion und reagiert mit primären Aminen zu fluoreszierenden Verbindungen mit einem Absorptionsmaximum von 380 nm und einer Emission bei 470 nm.<sup>[202]</sup> In späteren Arbeiten wurde der Fluoreszenzfarbstoff zur Analyse oberflächengebundener Amine von Polyethylenimin-Gruppen eingesetzt, um die Dichte der funktionellen Gruppen und die Sekundärstruktur zu untersuchen. Durch die Markierung mit Fluram<sup>®</sup> konnte gezeigt werden, dass die Aminogruppen an Trägeroberflächen reaktiv, zugänglich und fest gebunden vorlagen und somit für weitere Modifikationen genutzt werden können.<sup>[203]</sup> Die Reaktion von Fluram<sup>®</sup> mit primären Aminen ist in Abb. 7.21 am Beispiel von Aminopropyl-dextranen dargestellt.

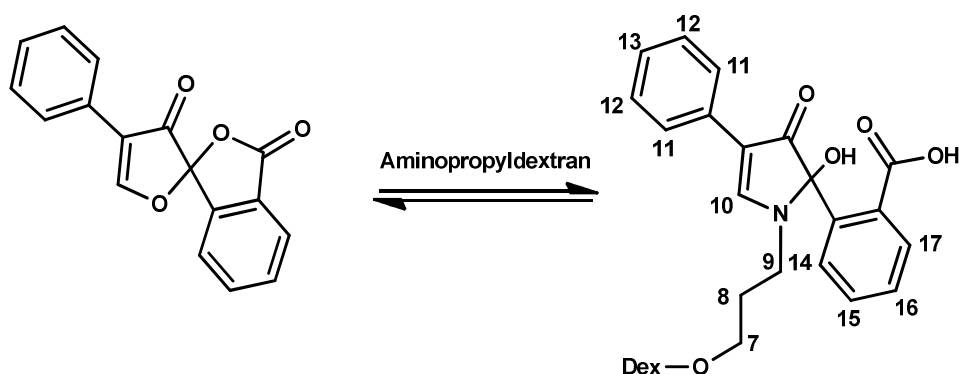


Abb. 7.21: Markierung von Aminopropyl-dextranen mit Fluram<sup>®</sup>.

In dieser Arbeit wurde eine Lösung aus Fluram<sup>®</sup> in Aceton zu einer Nanopartikeldispersion aus aminogruppenhaltigen Glucanen gegeben und nach 15 min Reaktionszeit erfolgte die Abtrennung des überschüssigen Labelingreagenzes durch Dialyse. Die Isolierung wurde mit Dünnschichtchromatographie überprüft. In Tabelle 7.9 sind die Nanopartikeldispersionen, die zur Funktionalisierung mit Fluram<sup>®</sup> eingesetzt werden sowie die entsprechenden Reaktionsbedingungen aufgeführt.

Tabelle 7.9: Reaktionsbedingungen zur Nanostrukturierung aminogruppenhaltiger Polysaccharide für die anschließende Markierung mit Fluram®.

Ansatz <sup>a</sup>	PS <sup>b</sup>	DS-Wert		FeNP-3 [μL]
		DS <sub>AP</sub>	DS <sub>CE</sub>	
<b>110808-C<sup>b</sup></b>	APD-30	0,28	2,40	0
<b>110808-D<sup>b</sup></b>	APD-30	0,28	2,40	20
<b>120130-D<sup>b</sup></b>	APD-32	0,63	0,85	20
<b>120130-F<sup>b</sup></b>	APD-20	1,32	0,30	20
<b>120130-H<sup>b</sup></b>	APD-6	0,09	0,84	20
<b>120416-C<sup>c</sup></b>	APD-32	0,63	0,85	20
<b>120416-D<sup>c</sup></b>	APD-32	0,63	0,85	-

<sup>a</sup> vergleiche Tab. 7.7, <sup>b</sup> vergleiche Tab. 5.1, <sup>c</sup> wie 120130-D.

Die auf eine Kieselgelplatte (für DC) aufgebrachten, mit Fluram® gelabelten nanostrukturierten Glucane zeigten bei  $\lambda = 245$  nm UV-Aktivität, die mit steigendem DS-Wert der Derivate zunahm. Nach Trocknung (je 10 Tropfen) auf Glasobjektträgern erfolgte die mikroskopische Untersuchung. In Abb. 7.22 sind die Mikrographen der fluoreszenzmarkierten Nanopartikeldispersionen 110808-C und 120130-F in 500-facher Vergrößerung zu sehen. Links dargestellt sind die Aufnahmen im Fluoreszenzmodus, rechts ohne Filter im Hellfeld. Die Aufnahmen wurden Institut für Halbleitertechnik in Zusammenarbeit mit Nico Lämmerhardt durchgeführt.

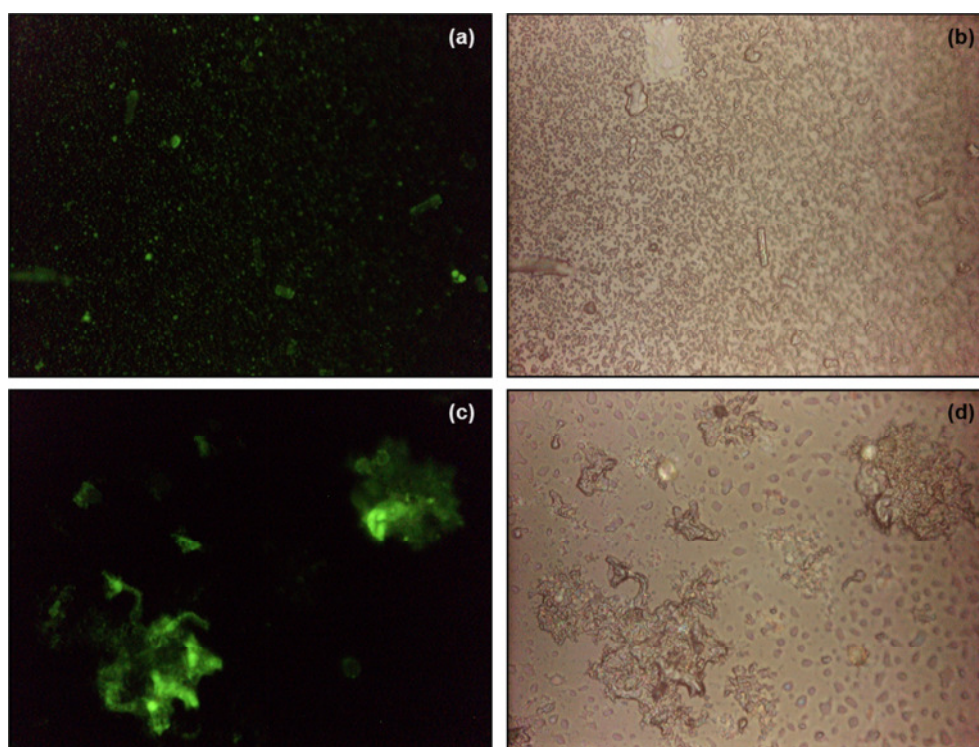


Abb. 7.22: Mikrographen der fluoreszenzmarkierten Polysaccharid-Nanopartikeldispersionen von 110808-C (APD-30,  $DS_{AP} = 0,28$ ) (a-b) und 120130-F (APD-20,  $DS_{AP} = 1,32$ ) (c-d) 500-fache Vergrößerung im Lichtmikroskop.

Alle mit Fluram<sup>®</sup> funktionalisierten Nanopartikeldispersionen fluoreszieren. In den Aufnahmen von 110808-C sind sogar die einzelnen Partikel erkennbar, während bei 120130-F eine Agglomeration (evtl. auch durch die Trocknung) stattgefunden haben muss. Die maximale Auflösung eines Lichtmikroskops liegt bei 500 nm. Damit die Fluoreszenz detektiert werden konnte, mussten die Belichtungszeiten mit ½ Sekunde je Aufnahme sehr hoch gesetzt werden. Bei 1000-facher Vergrößerung war keine Fluoreszenz mehr sichtbar, da die Konzentration des Markers und die Leistung des Mikroskops zu schwach waren. Die Lokalisierung der Fluoreszenz und damit die Position der Aminogruppen auf oder in den Partikeln konnte damit nicht erfasst werden. Die Verwendung eines konfokalen Laserscanning Mikroskops und spezieller mit Laser anregbaren Farbstoffen wäre ein möglicher Lösungsansatz für diese Problematik. Die kovalente Bindung von Fluram<sup>®</sup> an die Aminogruppen der Polysaccharid-Nanostrukturen konnte zudem mit IR- und NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden. In Abb. 7.23 sind die IR-Spektren von 120416-C und D gegenübergestellt. Die Ringschwingungen des gebundenen Farbstoffmoleküls sind mit 1491 und 1462 cm<sup>-1</sup> und die entsprechenden Deformationsschwingungen bei 943 - 686 cm<sup>-1</sup> gut zu identifizieren. Durch den Zusatz des Ferrofluids sind im Fingerprintbereich von 642 - 557 cm<sup>-1</sup> kleine Unterschiede zu Probe 120416-D zu erkennen.

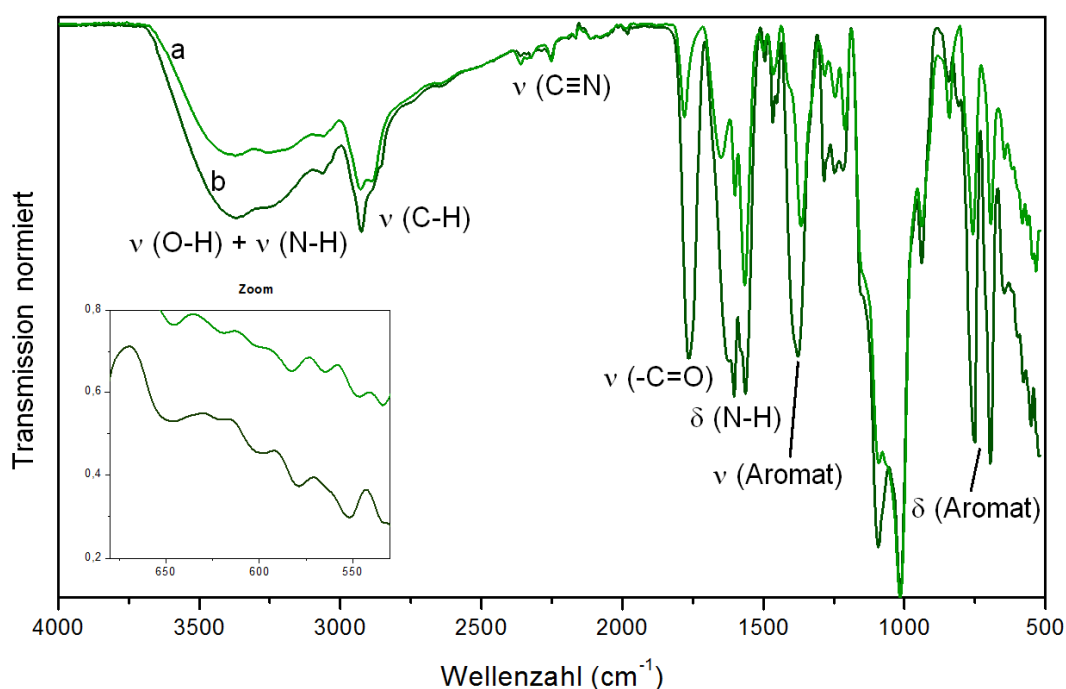


Abb. 7.23: ATR-IR-Spektren der mit Fluram<sup>®</sup> modifizierten Nanostrukturen aus (APD-32,  $DS_{AP} = 0,63$ ), (a) 120416-C mit FeNP-3 und (b) 120416-D ohne Eisenoxid-Nanopartikel.

Im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von Ansatz 120416-D sind nach einem Fluram<sup>®</sup>-Labeling die aromatischen Protonen des Flurams<sup>®</sup> bei 8,09 - 6,83 ppm zu erkennen (siehe Abb. 7.24). Im Vergleich zum Aminopropyldextran wird deutlich, dass nach erfolgreicher Umsetzung

mit dem Farbstoff die Signale der Methylengruppen bei 3,12 bzw. 2,00 ppm nicht mehr sichtbar sind (Abb. 7.24, Pfeilmarkierung). Die quantitative Umsetzung könnte aus besser aufgelösten Spektren berechnet werden.

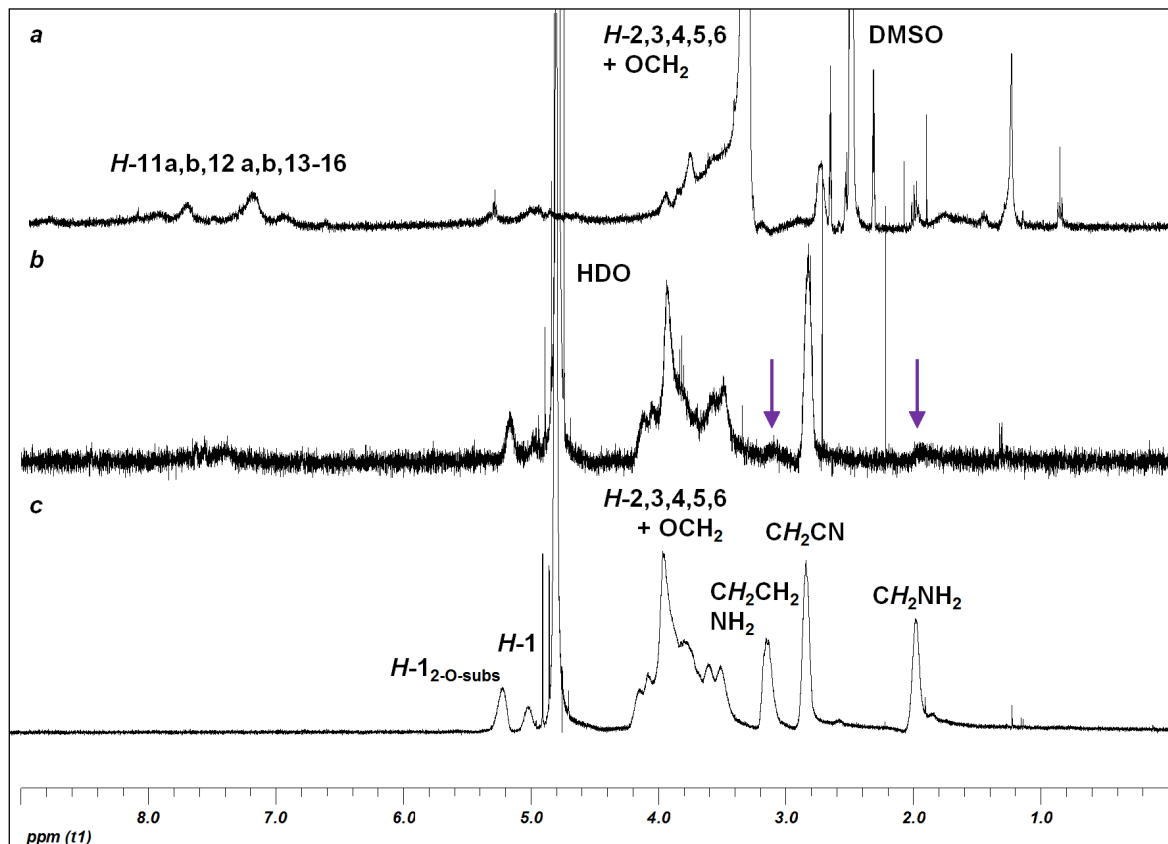


Abb. 7.24:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren (400 MHz) von (a) 120416-C mit Fluram<sup>®</sup> modifizierten Nanostrukturen (aus APD-32,  $\text{DS}_{\text{AP}} = 0,63$ ,  $\text{DS}_{\text{CE}} = 0,85$ ) in  $\text{DMSO-d}_6$  und (b) in  $\text{D}_2\text{O}$  im Vergleich zu (c) APD-32 in  $\text{D}_2\text{O}$  ( $\text{DS}_{\text{AP}} = 0,63$ ,  $\text{DS}_{\text{CE}} = 0,85$ , Nummerierung vgl. Abb. 7.21).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Aminogruppen der Hydrogelnanopartikel aus Aminopropyl-Cyanoethyl-Glucanen für eine Modifizierung mit Fluram<sup>®</sup> zur Verfügung stehen. Die Reaktion mit dem Fluoreszenzfarbstoff ist zudem eine schnelle Methode zur Markierung. Einen ähnlichen Ansatz stellten Nikolajski et al. vor indem sie aminofunktionalisierte Cellulosederivate mit den Fluoreszenzfarbstoffen Rhodamine B oder Isothiocyanat labelten. Der DS-Wert des Amins reichte von 0,46 bis 0,57 und wurde durch Elementaranalysen bestimmt. Durch den Dialyseprozess erhielten sie sphärische Nanopartikel im Bereich von 80 bis 200 nm mit enger Größenverteilung. Die Inkorporation dieser Partikel in Fibroblasten (BJ-1-htert) und Brustkarzinom MCF-Zellen war ohne Transfektionsreagenzien erfolgreich, wie durch Konfokale Laser Scanning Mikroskopie gezeigt werden konnte. Die Position der Fluoreszenzfarbstoffe in der Partikelmatrix wurde nicht untersucht.<sup>[201]</sup> Ähnliche Anwendungen wären für die in dieser Arbeit modifizierten Partikel denkbar. Bei einer vollständigen Reaktion der Aminogruppen mit Fluram wäre eine Quantifizierung dieser Gruppen möglich.



## 8 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit werden Studien über die Derivatisierungen von Dextran ( $\alpha$ -1,6-verknüpfte Glucopyranosyleinheiten mit Seitenketten) und Pullulan ( $\alpha$ -1,6-verknüpfte Maltotrioseeinheiten) vorgestellt. Die Produktcharakterisierung erfolgte durch ATR-IR- und NMR-Spektroskopie, Elementaranalyse und mittels GC-MS sowie Gaschromatographie nach Depolymerisation.

Bei den Alkylierungen mittels Williamsonscher Ethersynthese wurde der Einfluss verschiedener Reaktionsbedingungen wie Homogenität des Reaktionssystems, Basenart, (NaOH oder Li-Dimsyl), eingesetzte Äquivalente, Reaktionsdauer und Auswirkung von verschiedenen Molmassen untersucht. Ethylierung und Methylierung wurden verglichen. In Abhängigkeit von der Basenmenge (Li-Dimsyl) wurden für Dextran  $DS_{Me}$ -Werte von 0,77 - 1,98 und für Pullulan 0,77 - 2,70 erreicht. Die entsprechenden  $DS_{Et}$ -Werte lagen mit 0,33 - 1,65 deutlich tiefer. Die Reaktivität der OH-Gruppen in den Glucoseeinheiten war beim  $\alpha$ -1,6-verknüpften Dextran  $O-2 > O-4 \geq O-3$  und  $O-2 \gg O-3 > O-6 > O-4$  für die entsprechenden Alkylpullulane. Die Analyse der Substituentenverteilung in den Glucosebausteinen zeigte eine große Abweichung von einer statistischen Verteilung der Substituenten. Der Anteil von Glucosen, die noch nicht alkyliert oder bereits trialkyliert sind, war erhöht, während die Werte der mono- und disubstituierten Bausteine entsprechend tiefer ausfielen als für eine statistische Verteilung angenommen. In heterogenen Reaktionssystemen (NaOH, dispergiert in DMSO) ist diese Art der Abweichung bereits bekannt, bei der Alkylierung in einem homogenen Reaktionssystem (Li-Dimsyl in DMSO) wurde sie nicht erwartet.

Im Folgenden wurden Cyanoethylether der Glucane nach dem Mechanismus der Michael-Addition mit Acrylnitril hergestellt, die wegen ihrer elektrochemischen Eigenschaften als solche und als Vorstufen von Aminopropylethern von Interesse sind. Je nach verwendetem Reaktionssystem wurden DS-Werte von 0,3 bis 2,4 für Pullulane und Dextrane erreicht, wobei die Derivate ab einem DS von 1,5 nicht mehr wasserlöslich waren. Die Substituentenverteilung konnte nach Hydrolyse und Trimethylsilylierung gaschromatographisch bestimmt werden. Die daraus berechneten DS-Werte stimmten relativ gut mit den mittels NMR-Spektroskopie und Elementaranalyse ermittelten Werten überein. Da es sich bei der Michael-Addition um eine thermodynamisch kontrollierte Reaktion handelt, liegen die experimentellen Daten nahe an der statistischen Verteilung. Aus den GLC-Analysen konnte die Regioselektivität mit der Reihenfolge  $O-2 > O-4 > O-3$  für alle Cyanoethyldextrane ermittelt werden. Im Fall von Cyanoethylpullulanen veränderte sich die Ordnung der partiellen DS-Werte mit steigender Substitution zugunsten von

Position 6-OH (O-6 > O-4 > O-2 > O-3). IR- und NMR-Messungen zeigten keine oder nur marginale Entstehung von Nebenprodukten. Das elektrochemische Potential und die filmbildenden Eigenschaften könnten zudem weiter erforscht werden. Alternativ könnten durch den Einsatz von Cyanoalkylhalogeniden mit variabler C-Anzahl Spacer mit anderen Längen eingebracht werden und infolge der kinetischen Reaktionskontrolle ein anderes Muster eingeführt werden.

Durch eine folgende Reduktion der Cyanoethylgruppen konnten in einer Polymeranalogen Reaktion Aminofunktionen als reaktive Intermediate eingeführt werden. Bei einer partiellen Reduktion entstanden Aminopropyl-Cyanoethylderivate. Aminofunktionalisierte Glucane können in den verschiedensten biochemischen, analytischen und medizinischen Anwendungen eingesetzt werden. Beispiele sind der Einsatz als Komponente von Sensoren, zur Oberflächenbeschichtung oder zur Bindung von Enzymen.

Die Aminofunktionen wurden zur Kopplung von Signalmolekülen mittels reduktiver Aminierung genutzt. Aldehyde, wie Benzaldehyd, 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd, 3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxy-benzaldehyd, Maltose oder Maltotriose wurden bis zu einem molaren Verhältnis gekoppelter Aldehyde zu Aminofunktion von 1:1 gebunden. Der pH-Wert des Reaktionsmediums wurde entsprechend den verwendeten Aldehyden angepasst, wobei die reduktive Aminierung von aromatischen Aldehyden bei pH 4 begünstigt war. Die Umsetzung mit Maltose oder Maltotriose erforderte leicht alkalische Bedingungen (pH 9). Die Verlängerung der Reaktionszeiten zeigte sich erfolgreicher als die Erhöhung der Aldehyd- bzw. Reduktionsmitteläquivalente. Entsprechend könnten weitere Aldehyde mit bioaktiven Eigenschaften wie z.B. Fluoreszenz oder pharmakologisch wirksame Reagenzien gebunden werden.

Die derivatisierten Polysaccharide wurden hinsichtlich ihrer Eignung zur Nanostrukturierung durch Self-assembly mit und ohne Zusatz von ferromagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln getestet. Dynamische Lichtstreuung, Scanning Electron Microscopy (SEM), Energy-Filtered Transmissions Electron Microscopy (EF-TEM) und Parallel Electron Energy Loss Spectroscopy (PEELS) wurden zur Charakterisierung der entstandenen Nanostrukturen eingesetzt.

Die zuvor durchgeführte Synthese der Eisenoxid-Nanopartikel lieferte Partikel mit einer engen Größenverteilung ( $\bar{\varnothing} = 12,4 \pm 2,6$  nm). Die Stabilisierung bei pH 2 verhinderte Aggregations- oder Agglomerationsprozesse. Die Auswertung der Suzeptibilitätsdaten aus Magnetrelaxationsmessungen bestätigte die Ergebnisse der DLS- und TEM-Messungen und zeigte auch, dass die Partikel in den wässrigen Dispersionen mit gut differenzierbaren Relaxationssignalen vorliegen und eine Agglomeration deshalb ausgeschlossen werden kann.

Die hochcyanoethylierten Pullulane und Dextrane bildeten regulär geformte Nanostrukturen. Eine spezifische Wechselwirkung zwischen ferromagnetischen Partikeln und der Polysaccharidhülle war nachweisbar. Die Metalloxidpartikel wurden selektiv in die Polymermatrix eingelagert. Cyanoethylglucane mit einem DS-Wert  $< 2$  und komplett reduzierte Derivate (die folglich nur noch Aminopropylreste tragen) bildeten keine Nanostrukturen. Durch weitere Hydrophobisierung (z.B. durch Peracetylierung, oder Phenylisocyanatgruppen) könnte hier das amphiphile Gleichgewicht in Richtung Self-assembly verschoben werden. Bei partiell reduzierten Cyanoethyldextranen muss zum Self-assembly ein hoher Anteil an Cyanoethylgruppen verbleiben.

Glucanderivate, die durch reduktive Aminierung von Aminopropyldextranen und Aldehyden synthetisiert wurden, formen je nach ihrem amphiphilen Gleichgewicht Nanopartikel.

Aus *N*-(4-Hydroxy-3-methoxy)benzyl-aminopropyldextran ( $DS_{VAN} = 0,12$ ,  $DS_{CE} = 2,31$ ) und *N*-Benzyl-aminopropyldextran ( $DS_{BA} = 0,66$ ,  $DS_{CE} = 0,85$ ) entstanden mit Zusatz von Eisenoxidpartikeln Nanostrukturen mit einer diskreten Größenverteilung und Hauptpartikeldurchmessern von 199 nm bzw. 120 nm. Die magnetischen Eigenschaften der hergestellten Polysaccharid-beschichteten Eisenoxid-Nanopartikel sind mit kommerziell erhältlichen MRI-Kontrastmitteln (Fera-Spin<sup>TM</sup> R) vergleichbar. Der Einsatz in der klinischen Diagnostik und in Therapieformen wäre denkbar. Applikationen wie Wirkstofftransport und -freisetzung sowie magnetische Separation und Detektion von Komponenten in biologischen Systemen sind mit beschichteten Eisenoxid-Nanopartikeln möglich. Hierzu müssten die entsprechenden Modifizierungen und bei Anwendungen in biologischen Systemen Tests zur physiologischen Verträglichkeit (Biokompatibilität) durchgeführt werden. Die Aminofunktionen bieten die Möglichkeit Rezeptoren für gewünschte Erkennungsprozesse zu binden.

## 9 Summary and Outlook

In the present thesis derivatization studies about dextran ( $\alpha$ -1,6-linked glucan) and pullulan ( $\alpha$ -1,6-linked maltotriose units) are presented. Product characterization was accomplished by ATR-IR and NMR-spectroscopy, elementary analysis and by GC/GC-MS analysis after depolymerization.

To investigate the influence of different reaction parameters on alkylation according to the Williamson ether synthesis, homogeneity of the reaction system, type of base (NaOH or Li-dimsyl), reagent equivalents, reaction time, and the effect of different molar masses on the glucans were studied. Ethylation and methylation were compared. Depending on the reaction conditions degrees of methylation ranging from 0.77 to 1.98 for dextran and from 0.77 to 2.70 were achieved for pullulan. Corresponding values for ethylation were lower (0.33 to 1.65). The order of reactivity of glucose OH-groups was found to be O-2>O-4 $\ge$ O-3 for alkyl dextrans and O-2  $\gg$  O-3 > O-6 > O-4 for alkyl pullulans. The methyl pattern in the glucosyl units significantly deviated from a random distribution, not only in the heterogeneous NaOH/DMSO system, but also when soluble Li-dimsyl had been applied as base. Enhanced amounts of un- and trisubstituted moieties were found. This type of deviation was known for the heterogeneous reaction system (NaOH, dispersed in DMSO), but was not expected for a homogeneous system (Li-Dimsyl in DMSO).

Subsequently, cyanoethyl dextrans were prepared by Michael addition of acrylonitrile. These are interesting derivatives due to their electrochemical properties and have the potential to serve as precursors for aminopropylethers. Depending on the reaction conditions, DS values from 0.3 to 2.4 were achieved. Products with DS >1.5 are no longer water-soluble. The monomer composition was determined after hydrolysis or methanolysis and trimethylsilylation of the cyanoethyl glucans by gas chromatography. The results were in agreement with DS values obtained by NMR spectroscopy and elementary analysis. Michael addition is a thermodynamically controlled reaction and resulted in a substitution pattern close to the statistic model. Average reactivities of the  $\alpha$ -glucans dextran and pullulan were calculated from the GC data. The order of substitution was O-2 > O-4 > O-3 for dextran, while the relative degree of conversion changed with the DS from O-2 > O-4 > O-6 > O-3 to O-6 > O-4 > O-2 > O-3. Further research may investigate the conduction and film-forming properties of cyanoethyl glucans. By using cyanoalkyl halogenides different substitution patterns would be accessible due to the kinetic control of this reaction. In contrast to Michael addition of acrylonitrile, cyanoalkyl halogenides with variable C-number could be applied, giving the possibility of different spacer length.

Amino functionalization while preserving the polysaccharide backbone and maintaining the intrinsic properties of the polymer was achieved by reduction of the cyanoethyl glucans. Partial reduction led to aminopropyl cyanoethyl glucans.

Amino functionalized glucans are reactive intermediates and can be used in different biochemical, analytical and medical applications, for example as sensor component in surface coating or for coupling of enzymes.

Moreover, the introduced amino functions were used for the coupling of signal molecules by reductive amination.

Aldehydes like benzaldehyde, 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde, 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxy-benzaldehyde, maltose or maltotriose were bound. The molar ratio of coupled aldehyde to amino functions was up to 1:1. The pH was adjusted according to the aldehydes used. Reaction conditions at pH 4 were favorable for the bounding of aromatic aldehydes, while attachment of maltose and maltotriose was promoted at pH 9. Higher degrees of coupling were observed by prolonged reaction times. In contrast an increase in the amount of aldehyde was less successful. Further effort could be spent on binding bioactive aldehydes, e.g. enzymes, or fluorophores.

Furthermore, nanostructuring of the glucan derivatives by self-assembly was investigated with and without addition of magnetic iron oxide nanoparticles. Characterization of the nano scale material was performed by Dynamic Light Scattering (DLS), Scanning Electron Microscopy (SEM) and Energy-Filtered Transmissions Electron Microscopy (EF-TEM) with Parallel Electron Energy Loss Spectroscopy (PEELS).

The previously performed synthesis of iron oxide nanoparticles resulted in a narrow size distribution ( $\bar{\varnothing} = 12.4 \pm 2.6$  nm). Agglomeration or aggregation processes could be avoided through pH stabilization (pH 2). DLS, TEM and magnetic relaxation measurements confirmed these results.

Highly cyanoethylated glucans ( $DS > 2$ .) formed regularly nanostructures of spherical shape. Addition of ferromagnetic nanoparticles led to glucan-coated multicore ferromagnetic nanostructures. Quantitative entrapment of iron oxide during dialysis was observed, based on interactions of the cyanoethyl residues with the iron oxide core particles, as it was indicated by TEM and PEELS measurements. These new particles possess great potential as precursor for amino functionalized, magnetic architectures and for electrochemical applications. Further hydrophobization (peracetylation or coupling of phenylisocyanate) could be appropriate to improve self-assembly ability. Interestingly, cyanoethyl glucans with a  $DS < 2$  and completely reduced derivatives (only bearing aminopropyl residues) did not form nanostructures.

Glucan derivatives obtained by reductive amination of aminopropyl dextran and aldehydes formed nanostructures depending on their final amphilic balance. Particles in the nano

scale could be obtained from *N*-(4-hydroxy-3-methoxy)benzyl-aminopropyl-dextran ( $DS_{VAN} = 0.12$ ,  $DS_{CE} = 2.31$ ) and even from *N*-Benzyl-aminopropyl-dextran ( $DS_{BA} = 0.66$ ,  $DS_{CE} = 0.85$ ) after incubation with iron oxide nanoparticles. The mean diameter was determined with 199 nm and 120 nm. The magnetic properties are comparable to commercially available MRI contrast agents (Fera-Spin<sup>TM</sup> R). Application in diagnostics and therapeutic fields should be possible. Polysaccharide coated magnetic nanoparticles can be used in drug delivery, magnetic separation techniques and for detection of components in biological systems, e.g. by molecular recognition.

On account of this potential, the biocompatibility of glucan derivatives and their resulting nanostructures should be further tested. Furthermore amino functions possess the capability to bind receptors for desired recognition processes and give rise to further potential in biological applications.

## 10 Material und Methoden

### 10.1 Chemikalien

#### Polysaccharide:

Es werden folgende Polysaccharide der Firma Fluka BioChemika eingesetzt.

Dextrane:     6 kDa, *Leuconostoc ssp. strain 10817*  
                  15 - 25 kDa, *Leuconostoc mesenteroides*  
                  70 kDa, *Leuconostoc ssp.*  
                  500 kDa, *Leuconostoc ssp. strain 10817*  
Pullulan:     100 kDa, Fluka Analytical

Die verwendeten Polysaccharide werden vor ihrer Verwendung getrocknet. Hierzu werden etwa 5 g Dextran in einem Wägeschälchen bei 50 °C über Nacht im Vakkumttrockenschrank gelagert. Die Bestimmung der Trockenmasse erfolgte durch Differenzwägung von bis zur Massenkonstanz getrocknetem Polysaccharid und der Einwaage vor der Trocknung.

Die verwendeten Lösungsmittel besaßen HPLC-, p. A.- oder p. S.- Qualität. Im Folgenden sind die verwendeten Chemikalien alphabetisch dargestellt.

Acetylchlorid (puriss)	puriss. P.a. $\geq$ 99.0 %; Fluka
Acrylnitril	99 %, Janssen, stabilisiert mit 35 - 45 ppm Hydrochinon-monomethylether
Benzaldehyd	puriss, Fluka
Cobalt(II)-chlorid-Hexahydrat:	p.a., Acros Organics
3,5-Di- <i>tert</i> -butyl-4-hydroxy -benzaldehyde hemihydrate (BHT-CHO)	99 %, Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	puriss.; absolute, over molecular sieve (H <sub>2</sub> O < 0,01 %), Sigma Aldrich
Eisen(II)-chlorid-Tetrahydrat	p.a. ( $\geq$ 99 %), Fluka
Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat:	p.a. ( $\geq$ 99 %), Riedel de Haën
Ethyljodid	ReagentPlus® 99 %, Sigma-Aldrich

Fera-Spin™ R	MRI contrast agent for pre-clinical imaging (Mean particle size: 60 nm (hydrodynamic diameter)), Particle size range: 10 - 90 nm, Miltenyl Biotec Inc.
Fluram®	Fluorescamie, p.a. ( $\geq 99\%$ ), Fluka,
Iodmethan (CH <sub>3</sub> I)	99 %, Sigma-Aldrich
Methanol (SeccoSolv®)	getrocknet (max 0,003 % H <sub>2</sub> O, Seccosolv®, Merck
Methyl-Lithium	purum, Aldrich, 5 % in Diethylether
Maltose Monohydrate	Merck
Maltotriose	>98.0%, TCI Europe N.V.
Natriumborhydrid	99 %, Merck
2-Picolinboran-Komplex	95 %, Aldrich
Trifluoressigsäure	purum, Fluka
Vanillin	99 % Sigma-Aldrich

## 10.2 Geräte und Materialien

### Dialyse

Dialysiermembranen:	MWCO 14 kDa, Breite 2,5 cm, regenerierte Cellulose, Fa. Carl Roth
	MWCO 3,5 kDa, Breite 4,5 cm, Spectra/Por®, Spectrum Laboratories Inc.

Die Dialyse erfolgte gegen destilliertes Wasser.

### Dünnschichtchromatographie

Stationäre Phase:	DC-Alufolien 20 cm x 20 cm Kieselgel 60 F254, Fa. Merck
Detektion:	a) universal: Tauchen in 10 %ige ethanolische Schwefelsäure, danach Verkohlung mittels Heißluftfön oder Trockenschrank ( $> 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) b) UV Detektion bei $\lambda = 254\text{ nm}$ oder $366\text{ nm}$ c) optische Detektion
Mobile Phase:	variabel



### **Dynamische Lichtstreuung**

- Geräte:
- a) Wyatt Dyna Pro Temperature controlled microsampler (Laser  $\lambda = 589 \text{ nm}$ ), Wyatt Technologie Cooperation
  - b) Zetasizer Ver 6.0.1, Malvern Instruments Ltd

Die Messungen wurden a) am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig und b) am Institut für Partikeltechnik der TU Braunschweig durchgeführt.

### **Elektrosprayionization-Massenspektrometrie (ESI-MS)**

- Gerät: Esquire HCT Ultra ETD II (Bruker Daltronics, Bremen, Germany)
- Software: Bruker DataAnalysis Esquire-LC, Bruker Daltronik GmbH
- Flow Rate: 140 - 200  $\mu\text{L/h}$  Cap Exit: 120 V
- Modus: positiv Cap Exit Offset: 90 V
- Dry Gas: 6 L/min Skim 1 : 30 V - 210 V
- Dry Temperature: 325 °C Skim 2 : 10 V
- Capillary:  $\pm 4500 \text{ V}$  Trap Drive: 50,4
- End Plate Offset:  $\pm 500 \text{ V}$
- Nebulizer Gas:  $\text{N}_2$ , 10 psi

### **Elementaranalyse**

- Gerät: Thermoquest EA 1112, Carlo Erba Instruments Flash, Italien
- Column: Teflon,  $l = 80 \text{ cm}$ , 6 mm x 4 mm, Material Porapak QS, 80 - 100 mesh
- Ofentemperatur: 85 °C
- Brenntemperatur: 1000 °C
- Trärgas: Helium, 30 mL/min

### **Fluoreszenzmikroskop**

- Gerät: Leitz Ergolux
- Kamera: Nikon DN100

Die Messungen wurden im Institut für Halbleitertechnik der TU Braunschweig in Zusammenarbeit mit Nico Lämmerhardt durchgeführt.

### Gaschromatographie (GC)

Gaschromatograph:	GC 2010, Shimadzu
Säule 1:	Zebron ZB-5-HT Inferno, Phenomenex (5%-Phenyl-Methyl-Polysiloxan) 28 m x 0,25 mm ID x 0,25 µm Filmstärke Retention Gap 1,5 m
Säule 2:	Phenomenex ZB5-MS, 30 m x 0,25 mm ID, Filmstärke: 0,25 µm
Autosampler:	AOC X-20i
Injektor:	Split/Splitless, 250 °C, Split : 0
Injektionsvolumen:	1 µL
Trärgas:	Wasserstoff (40 cm/sec, linear velocity mode)
Detektor:	FID, 310 °C
Brenngase:	Wasserstoff (40 kPa), Synthetische Luft (400 kPa)
Make up Gas:	Stickstoff (30 kPa)
Software:	Shimadzu GC-Solution Chromatography Data System, Version 2.3

#### Temperatur-Programme:

##### (a) Methylglucose:

Hydrolyse → Reduktion → Acetylierung

60 °C (1 min hold time), 20 °C/min bis 200 °C, 4 °C/min auf 250 °C, 20 °C/min auf 310 °C (10 min hold time)

Methanolyse → Trimethylsilylierung

60 °C (1 min hold time), 20 °C/min bis 130 °C, 4 °C/min auf 260 °C, 50 °C/min auf 310 °C (10 min hold time)

##### (b) Ethylglucose:

Hydrolyse → Reduktion → Acetylierung

60 °C (1 min hold time), 20 °C/min bis 200 °C, 4 °C/min auf 250 °C, 20 °C/min auf 310 °C (10 min isotherm)

**(c) Cyanoethylglucane:**

Hydrolyse → Trimethylsilylierung

60 °C (1 min); 20 °C/min auf 130 °C, 4 °C/min auf 260 °C, 50 °C/min auf 310 (10 min)

**Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)**

Gaschromatograph:	Agilent 6890 / JOEL GCmate II
Modus:	El, positiv, 70 eV
Injektor:	Split (10 : 1), 250 °C
Injektionsvolumen:	1 µL
Säule:	Phenomenex ZB5-MS, 30 m x 0.25 mm ID, Filmdicke: 0.25 µm
Trärgas:	He (1 mL/min, constant flow mode)
Transfer Line:	250 °C
Ion Source:	180 °C
Ionisationsspannung:	70 eV
Temperaturprogramm:	entspricht dem jeweiligen bei der Gaschromatographie
Massenspektrometer:	JMS-T100GC (GCACcuTOF, JEOL, Japan) time of flight
Auswertung:	AMDIS 32, NIST

**Gefriertrocknung**

Gerät:	Alpha 2+, Firma Christ, Pumpe Vacuum Duo 5, Ethanolbad
--------	--

**Heizblöcke**

Gerätetypen:	ReactiTherm™ 18971, Heating/Stirring module, Firma Pierce  Pierce ReactiTherm™ # 18821, Heating/Stirring module Thermo Scientific
--------------	---

## ICP-OES

Die Messungen wurden am Institut für ökologische und nachhaltige Chemie der TU Braunschweig von Frau Christiane Schmidt durchgeführt.

Gerät:	radiales ICP-OES Vista MPX, Fa. Varian, Darmstadt
Zerstäuber:	Seaspray-Zerstäuber, Zyklon-Zerstäuberchamber, 240 kPa
Leistung:	1,20 kW
Plasmagas:	Ar, 15,0 L/min
Hilfsgas:	Ar, 1,50 L/min
Emissionslinien Eisen:	Fe-Ionemissionslinien (nm): 234,350/ 238,204/ 239,563/ 259,940/ 260,709/ 261,187
Interne Referenzlinie:	Ar I 470,067 nm
Kalibration:	Stammlösung Fe 10,000 mg/L (Specpure, Fa. Alfa Aesar), externe Kalibrierung mit 5 - 200 mg/L Fe
Probenvorbereitung:	Aufschluss mit HCl (konz.) 2 h Rühren bei RT
Messwiederholungen:	3-fach

## Infrarot-Spektroskopie (ATR-IR)

Gerät:	Bruker Tensor 27
Technik:	Diamant-ATR (Attenuated Total Reflection)
Anzahl der Scans:	32
Scan Range:	600 - 4000 $\text{cm}^{-1}$

## Magnete

Zur Sedimentation der Eisenoxid-Nanopartikel wurde eine Platte mit 16 flächig angeordneten Magneten eingesetzt.

Typ:	Neodym-Magnet, N33H
Maße:	20 x 5 mm
Eigenschaften:	9800 Gauss

### Magnetrelaxometriemessungen (MRX)

Die Magnetrelaxometriemessungen wurden am MRX-Forschungssystem des Instituts für Elektrische Messtechnik und Grundlagen der Elektrotechnik der TU Braunschweig von Erik Heim und Aidin Lak durchgeführt. Die Messeinheit besteht aus einem Helmholtz-Spulensystem zur Magnetisierung der Probe und einer differentiellen Anordnung von zwei Fluxgate-Magnetometern. Das Probengefäß wird zwischen zwei differentiell angeordneten Fluxgate-Sensoren platziert. Diese Sensoren sind mit ihrer empfindlichen Achse senkrecht zum homogenen Magnetisierungsfeld der Helmholtz-Spule angebracht. Durch diese Anordnung der Sensoren werden magnetische Störsignale der Umgebung kompensiert und nur das Streufeld der Probe wird erfasst. Die Messungen erfolgen bei Raumtemperatur. Als Brown-Referenz wird die Nanopartikel-Probelösung verwendet. Für die Néel-Referenz werden die Nanopartikel in gesättigter D-Mannit-Lösung gelöst und gefriergetrocknet.

Magnetometer:	Fluxgate Sensoren von Bartington (3 pT/Hz, Bandbreite 3 kHz)
Magnetisierungsfeld $H_{\text{ext}}$ :	2 mT (statisches Gleichfeld)
Anstiegszeit $t_{\text{mag}}$ :	2 s
Probenvolumen:	150 $\mu\text{L}$

### Magnetpartikelspektroskopie (MPS)

Für die Magnetpartikelspektroskopie wurden Messungen an einem MPS-Forschungssystem des Instituts für Elektrische Messtechnik und Grundlagen der Elektrotechnik der TU Braunschweig von Thilo Wawrzik und Hilke Remmer durchgeführt. Die Messanordnung besteht aus einem Spulensystem mit einer Spule zur Anregung (sinusförmiges Anregungsfeld bis 25 mT @10kHz, Verstärker: D/A NI PCI-6733 Wandlerkarte und Omnitronic P-2000 Audioverstärker) und zwei gradiometrisch angeordneten Spulen zur Detektion (14 bit A/D NI PCI-6133 Wandlerkarte mit einer Abtastrate von 2 MS/s). Als Brown-Referenz wird die Nanopartikel-Probelösung verwendet. Für die Néel-Referenz werden die Nanopartikel in gesättigter D-Mannit-Lösung gelöst und gefriergetrocknet. Für eine bessere Reproduzierbarkeit (Unabhängigkeit von Probenmenge und -konzentration) erfolgt eine Normierung auf die 3. Harmonische.

Anregungsfeldstärke $H_{\text{ext}}$ :	25 mT (magnetisches Wechselfeld)
Anregungsfrequenz:	10 kHz
Probenvolumen:	150 $\mu\text{L}$

## NMR-Spektroskopie

Gerät 1:	300 MHz, AV 300, Bruker Daltronik GmbH
Gerät 2:	400 MHz, Avance-Spektrometer, Bruker Daltronik GmbH
Gerät 3:	600 MHz, Avance DMX 600, Bruker Daltronik GmbH

Als Lösungsmittel für die NMR-Spektroskopie werden  $D_2O$ ,  $MeOH-d_4$  oder  $DMSO-d_6$  verwendet. Die Kalibration erfolgte entsprechend des jeweiligen Lösungsmittels.

## Scanning Electron Microscope (SEM)

Die Messungen wurden an KTH (Royal Institute of Technology) von Sevil Atarijabarzadeh durchgeführt.

Gerät:	Hitachi S-4800 FE-SEM (Tokyo, Japan)
Probenvorbereitung:	Adsorption der Nanopartikeldispersionen auf kolloidalem Graphit und Trocknung für mind. 48 Stunden im Exsikkator

## Transmission Electron Microscop (TEM)

Die Messungen wurden am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig von Dr. Heinrich Lünsdorf durchgeführt.

Gerät:	EF-TEM Libra 120 plus Zeiss, bei 120 kV
Probenvorbereitung:	Adsorption der Nanopartikeldispersionen auf hydrophilisiertem Carbonflim, Trocknung bei Raumtemperatur
Aufnahmeparameter:	2x2k SharpEye CCD Kamera (gekühlt), Tröndle, Moorenweiss, Germany
Software:	ITEM Software (OSIS, Münster, Germany).
PEELS Spektren:	Emissionsstrom: 2 $\mu A$ ; Spektrum Vergrößerung = x100; Beleuchtungsapertur: 0,5 mrad; Spektrumaufnahme: 5 sec
ESI Serien:	Vergrößerung: x12500; Spektrometer Eingangsapertur: 100 $\mu m$ ; Spaltbreite: 9 eV; Beleuchtungsapertur: 0,8 mrad; Spektrumaufnahme: 50 sec; $E_{max}$ : 712 eV; W1: 690 eV; W2: 660 eV; Emissionsstrom: 2 $\mu A$ von Eisen und Sauerstoff nach Hedrich et al. <sup>[204]</sup>

## Ultraschall

Gerät:	Branson Sonifier 450 (TM2)
Horn:	1/2" Diamter Tapped Disrupter (Frequency 19.850 - 20.050 kHz)
Tip:	Tapa Red Microtips (5 mm)

## 10.3 Synthesevorschriften

### 10.3.1 O-Alkylglucane

#### Allgemeine Arbeitsvorschrift: Alkylierungen mit Li-Dimsyl

Die Alkylierungsreaktionen wurden in Anlehnung Hakomori<sup>[47]</sup> durchgeführt. 100 - 500 mg des getrockneten Polysaccharids (Pullulan, Dextran) werden in einen wasserfreien Schlenkkolben eingewogen und in DMSO (10 bis 50 mL) für 24 h unter Rühren gelöst. Liegt eine klare Polysaccharidlösung vor, wird die Li-Dimsyl-Lösung in einem ausgeheizten Schlenkkolben unter Stickstoffatmosphäre hergestellt. Hierzu wird DMSO mit der entsprechenden Menge an Methyllithium (1,6 M in Ether) versetzt. Das während der Bildung des Methylsulfinylmethanid-Anions (Li-Dimsyl) entstehende CH<sub>4</sub> und der Ether der Methyllithiumlösung entweichen durch ein mit Kanülen perforiertes Septum. Die Reaktionszeit beträgt 1 h. Es muss eine klare Lösung vorliegen. Die Dimsyl-Lösung wird zur Polysaccharidlösung gegeben. Es werden 0,25 - 2 eq der Base/OH eingesetzt. Nach 30 min bis 1 h Reaktionszeit, wird unter Kühlung im Wasserbad das jeweilige Alkylierungsmittel (Methyliodid oder Ethyliodid, 0,30 - 2,4 eq/OH) zugesetzt. Nach 24 h werden die Reste des Alkylierungsmittels im Hochvakuum entfernt. Das Reaktionsgemisch wird in einen Dialyseschlauch (MWCO 12-14 kDa) überführt. Die Dialyse wird drei Tage mit mindestens 7-fachen Wasseraustausch durchgeführt. Anschließend wird das Reaktionsprodukt gefriergetrocknet. Die Einwirkzeit der Base wird in den Ansätzen D-14 bis D-17 von 3 - 1500 min variiert. Für Ansatz D-33 wurden 100 mg Dextran (6 kDa) in 20 mL DMSO mit 2 eq. Li-Dimsyl/OH-Gruppe und 2,5 eq. Mel/OH-Gruppe eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen mit Ein- und Auswaagen befinden sich in den Kapiteln 3.1.4 bis 3.1.6.

#### Allgemeine Arbeitsvorschrift: Alkylierungen mit NaOH in Wasser

Für die Versuchsansätze D-18 bis D-21 werden etwa 500 mg der Dextrane in 50 mL Wasser unter 24 h Rühren gelöst. Anschließend wird Natriumhydroxid zugesetzt. Es folgt die Zugabe der entsprechenden Menge Alkylierungsmittel, hier Methyliodid. Von diesem

Versuchsansatz wird nach 72 h die Hälfte abgenommen und dialysiert. Nach 144 h wird die restliche Reaktionslösung dialysiert. Die Reaktionsbedingungen mit Ein- und Auswaagen befinden sich in Kapitel 3.1.7, Tabelle 3.3.

IR (Diamant-ATR):  $\tilde{\nu}$  (cm<sup>-1</sup>) = 3300 - 3600 (OH, Maximum abhängig vom DS-Wert), 2919 - 2889 (CH, CH<sub>2</sub>, aliph.), 1451, 1317 (CH, CH<sub>2</sub>), 1131, 1067 (C-O-C).

**Methyldextran** <sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 5,17 (1 H, *H*-1<sub>2-O-subst</sub>), 4,95 (1 H, *H*-1, unsubstituiert), 4,05 - 3,23 (6 H + DS \* 3 H, *H*-2, 3, 4, 5, 6 a, b + OCH<sub>3</sub>).

**Dextran nativ** <sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 4,97 (1 H, *H*-1), 4,03 - 3,38 (6 H, *H*-2, 3, 4, 5, 6 a, b).

### 10.3.2 O-Cyanoethylglucane

Die Cyanoethylglucane mit einem DS-Wert größer 2 werden in Anlehnung an Onda dargestellt.<sup>[65]</sup> Acrylnitril (4,65 mL, 23 eq/Glc) und Aceton (4,75 mL) werden zu einer Lösung der Polysaccharide (Dextran 6 kDa und Pullulan 100 kDa, 500 mg, 3,08 mmol Glc) in Wasser mit NaOH (250 mg, 2 eq/Glc) gegeben. Der Reaktionsansatz wird für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Produkt wird mittels Acetonzugabe (150 mL) gelöst und durch dreimaliges Präzipitieren mit Wasser gereinigt.

Die Cyanoethylierungsreaktionen für Derivate mit niedrigem bis mittlerem DS-Wert orientieren sich an den Reaktionsbedingungen von Gonera<sup>[127,128]</sup> und Verraest.<sup>[63,64,126]</sup> Die Polysaccharide (Dextran 6 kDa oder Pullulan 100 kDa, 300 bis 6000 mg Polysaccharid in 1 bis 20 mL Wasser) werden bis zu einer Einwaage von 300 mg in ein 5 mL Vial eingewogen. Für größere Mengen werden Glaskolben genutzt. Nach Zugabe von Wasser wird 10 min gerührt. Es folgt die Zugabe von NaOH und eine Rührperiode von 30 min, wonach das Acrylnitril in Mengen von 1 bis 10 eq/AGU zugesetzt wird. Der Ansatz wird für 30 min bei 45 °C gerührt. Um eine bessere Vermischung von Wasser und Acrylnitril zu erreichen, wird bei einigen Ansätzen Aceton zugegeben. Nach Versuchsende wird auf Raumtemperatur abgekühlt und mit HCl neutralisiert. Die genauen Parameter der einzelnen Versuche befinden sich in Tabelle 4.1. Das Produkt wird durch Dialyse (MWCO 3,5 kDa für Dextran und 12-14 kDa für Pullulan) und anschließende Gefriertrocknung isoliert. Die Bestimmung des Substitutionsgrades erfolgt mittels Elementaranalyse, Gaschromatographie und <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie.



Tabelle 10.1: Cyanoethylglucane: Ergebnisse der Elementaranalysen.

Ansatz	N [%]	C [%]	H [%]	C/N	DS [N] <sup>a</sup>	DS [C/N] <sup>b</sup>
<b>CED-1</b>	9,48	51,31	6,07	5,41	1,73	1,81
<b>CED-2</b>	9,26	51,14	6,06	5,52	1,67	1,74
<b>CED-3</b>	8,73	50,69	6,05	5,81	1,52	1,59
<b>CED-4</b>	9,52	51,35	6,02	5,39	1,74	1,82
<b>CED-5</b>	5,79	47,65	6,12	8,24	0,86	0,91
<b>CED-6</b>	12,23	54,60	5,96	4,46	2,68	2,72
<b>CED-8</b>	3,18	42,68	6,46	13,44	0,42	0,48
<b>CED-8</b>	3,02	42,96	6,25	14,23	0,40	1,55
<b>CED-9</b>	8,53	50,06	5,82	5,87	1,47	0,70
<b>CEP-11</b>	4,52	45,09	5,93	9,98	0,63	0,67
<b>CEP-12</b>	4,54	46,25	6,11	10,20	0,64	0,70
<b>CEP-13</b>	4,65	46,33	6,21	9,97	0,66	0,70
<b>CEP-14</b>	4,69	46,65	6,55	9,95	0,66	0,54
<b>CEP-15</b>	3,69	44,49	6,30	12,06	0,50	0,65
<b>CEP-16</b>	4,32	45,32	6,32	10,49	0,60	2,20
<b>CEP-17</b>	11,41	54,55	6,23	4,78	2,36	1,53
<b>CEP-19</b>	5,99	47,08	6,27	7,87	0,90	1,42
<b>CEP-20</b>	8,10	50,10	6,02	6,19	1,36	0,86

<sup>a</sup> DS-Wert über Stickstoffgehalt berechnet, <sup>b</sup> DS-Wert über C/N Verhältnis berechnet.

IR (Diamant-ATR):  $\tilde{\nu}$  (cm<sup>-1</sup>) = 3465 (s, OH, DS-abhängig), 2923, 2893 (m, CH, CH<sub>2</sub>, aliph.), 2252 (w, C≡N, Nitril), 1640 (m, OH), 1467, 1409, 1324 (CH, CH<sub>2</sub>), 1271, 1099, 1009 (s, C-O).

### DS-Wert < 2

**CED-5 und CED-9:** <sup>1</sup>H-NMR: (D<sub>2</sub>O, 300 MHz),  $\delta$  (ppm): 5,19 (1 H, *H*-1<sub>2-O-subst</sub>), 5,00 (1 H, *H*-1, unsubstituiert), 4,20 - 3,37 (6 H + DS \* 2H, *H*-2, 3, 4, 5, 6 a, b + OCH<sub>2</sub>), 2,82 (2 H, CH<sub>2</sub>CN).

**CEP-17:** <sup>1</sup>H-NMR: (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz),  $\delta$  (ppm): 5,95 - 4,75 (*OH*-2, *OH*-3, der Glucosyleinheit A, B und C + *H*-1, substituiert und unsubstituiert, Glucosyleinheit A, B und C), 4,11 - 3,20 (6 H, *H*-2, 3, 4, 5, 6 a, b + OCH<sub>2</sub>), 2,77 (2 H, CH<sub>2</sub>CN).

### DS-Wert > 2

**CED-6:** <sup>1</sup>H-NMR: (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz),  $\delta$  (ppm): 5,03 (1 H, *H*-1), 5,40 - 4,64 *OH*-4, *OH*-3, *OH*-2 überlapped mit *H*-1 Signalshift durch Substitution), 4,10 - 3,62 (6 H + DS \* 2 H, *H*-2, 3, 4, 5, 6 a, b + OCH<sub>2</sub>), 2,76 (2 H, CH<sub>2</sub>CN).

**CEP-19 und CEP-20:**  $^1\text{H-NMR}$ : ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz),  $\delta$  (ppm): 5,77 - 4,86 ( $\text{OH-2}$ ,  $\text{OH-3}$ , der Glucosyleinheit A, B und C +  $\text{H-1}$ , substituiert und unsubstituiert, Glucosyleinheit A, B und C), 4,21 - 3,36 (6 H,  $\text{H-2}$ , 3, 4, 5, 6 a, b +  $\text{OCH}_2$ ), 2,80 (2 H,  $\text{CH}_2\text{CN}$ ).

### 10.3.3 O-Aminopropylglucane

Die Reduktion der Cyanoethyl-dextrane zu den Aminopropyl-derivaten erfolgt in Anlehnung an Gonera, Verraest und Cuber.<sup>[63,64,128]</sup> Das jeweilige Cyanoethylglucan wird mit Cobaltchlorid (0,55 - 4,50 eq/CE-Gruppe) in einem ausreichend großen Rundkolben (für 200 mg im 500 mL Rundkolben) eingewogen, mit Wasser versetzt und gerührt. Bei Cyanoethyl-derivaten mit einem  $\text{DS}_{\text{CE}} > 2$  wird das Polysaccharid zunächst in 1 mL DMSO gelöst, dann werden Wasser und Cobaltchlorid zugegeben. Liegt eine klare Lösung vor wird das erst kurz zuvor in Wasser gelöste  $\text{NaBH}_4$  (1 bis 15 eq/CE-Gruppe) mit einer Spritze über ein Septum langsam und unter kräftigem Rühren zugegeben. Es muss eine weitere Kanüle zur Entweichen des entstehenden Wasserstoffs angebracht sein. Ist die Zugabe des Reduktionsmittels beendet, wird die Mischung eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden die entstandenen, schwarzen Rückstände von Co und Cobaltborid vorsichtig mit verdünnter Salzsäure gelöst. Die Reinigung des Produktes erfolgt mittels Dialyse und Gefriertrocknung. Die genauen Parameter der einzelnen Versuche befinden sich in den Tabellen 5.1 bis 5.3.

Tabelle 10.2: Aminopropylglucane: Ergebnisse der Elementaranalysen.

Ansatz	N [%]	C [%]	H [%]	C/N	DS [N] <sup>a</sup>	DS [C/N] <sup>b</sup>
APD-1	8,43	49,55	6,14	5,88	1,50	1,55
APD-2	4,88	42,60	6,37	8,73	0,71	0,84
APD-3	4,70	42,45	6,49	9,03	0,68	0,80
APD-4	5,04	44,17	6,16	8,77	0,74	0,83
APD-5	5,24	44,25	6,02	8,44	0,77	0,88
APD-7	5,57	45,40	6,25	8,15	0,84	0,92
APD-11	6,14	38,88	7,84	6,33	0,95	1,36
APD-12	5,67	35,83	7,60	6,32	0,86	1,36
APD-13	6,10	38,79	7,59	6,36	0,95	1,36
APD-14	5,68	38,50	7,25	6,78	0,86	1,23
APD-15	3,88	38,98	7,25	10,06	0,53	0,69
APD-16	2,58	40,37	7,18	15,68	0,33	0,39
APD-17	4,41	39,33	7,15	8,92	0,62	0,81
APD-18	2,68	38,94	6,82	14,56	0,35	0,43

<sup>a</sup> DS-Wert über Stickstoffgehalt berechnet, <sup>b</sup> DS-Wert über C/N Verhältnis berechnet.

IR (Diamant-ATR):  $\tilde{\nu}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3490 - 3234 (OH + NH), 2919, 2882 (CH,  $\text{CH}_2$ , aliph.), 1640 (OH), 1550 (NH), 1159, 1099, 1001 (s, C-O).

**APD-15** ( $DS_{AP} = 0,90$ )  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz)  $\delta$  (ppm): 5,21 (1 H,  $H-1_{2\text{-O-subst}}$ ), 4,97 (1 H,  $H-1$ , unsubstituiert), 4,25 - 3,35 (6 H +  $DS \cdot 2$  H,  $H-2$ , 3, 4, 5, 6 a, b +  $H-7$ ), 3,15 (2 H,  $H-9$ ), 2,00 (2 H,  $H-8$ ).

### 10.3.4 Reduktive Aminierung

Die Kopplung von Aldehyden und Aminopropylglucanen mittels reduktiver Aminierung orientiert sich an der Arbeit von Unterier.<sup>[138]</sup> Die genauen Versuchsbedingungen befinden sich in Tabelle 6.1. Das Aminopolysaccharid wird in einen Rundkolben eingewogen, mit dem in Methanol gelösten Aldehyd (4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd, 3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxy-benzaldehydhemihydrat BHT-CHO, gebunden als BHT abgekürzt, Maltose oder Maltotriose 0,8 bis 10 eq/Aminogruppe) versetzt und unter Rühren in Methanol gelöst (bzw. dispergiert). Die pH-Wert-Einstellung erfolgt mit verdünnter HCl bzw. NaOH. Die Ansätze werden bei 40 °C für 3 h gerührt, wobei in allen Fällen eine komplette Lösung des Polysaccharids eintrat. Als Reduktionsmittel wird eine methanolische Lösung von Picolinboran eingesetzt, welche in zwei Schritten zum Reaktionsgemisch gegeben wird. Zwischen den Zugaben liegen 45 min Reaktionszeit bei 40 °C. Im Fall von  $G_2-7$  und  $G_2-8$  wird das Reduktionsmittel in drei Schritten zugegeben. Die Konzentration des Reduktionsmittels wird so gewählt, dass immer doppelt so viele Äquivalente an Picolinboran wie an Aldehyd eingesetzt werden; bei Ansatz Van-3 wird die Vierfache Menge gewählt. Im Fall von BHT-6 wird die Reaktionszeit verlängert. BHT-CHO und das Aminopropyl-dextran werden für 24 h bei 40 °C zur Reaktion gebracht und Picolinboran wird in zwei Schritten in einer Gesamtreaktionszeit von 29 h zugegeben (zweite Zugabe nach 5 h). Die Isolierung erfolgt mittels Dialyse. Für die Ansätze mit BHT-CHO wird der überschüssige Aldehyd zusätzlich mit Petrolether extrahiert. Die Reaktionsbedingungen mit Ein- und Auswaagen befinden sich in Tabelle 6.1.

#### **N-(Benzyl)-3-aminopropyl-dextran (Bn-3)**

IR (Diamant-ATR):  $\tilde{\nu}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3430 - 3339 (O-H, N-H), 3058 + 3020 (aromatisch), 2924, 2872, 2791 (CH,  $\text{CH}_2$  aliph.), 1591 + 1491 (aromatisch), 1013 (C-O), 733 + 699 (=C-H monosubs. Aromat).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{MeOH-}d_4$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm) = 7,40 (5 H,  $H-12$  a, b, 13 a, b, 14), 5,04 (1 H,  $H-1$ ), 4,23 - 3,23 (6 H +  $DS \cdot 2$  H,  $H-2$ , 3, 4, 5, 6 a, b +  $H-7$  +  $H-10$  a, b), 3,18 - 1,70 (4 H,  $H-9$  +  $H-8$  mit und ohne gekoppeltem Aldehyd).

#### **N-(4-Hydroxy-3-methoxy)benzyl-aminopropyl-dextran (Van-13)**

IR (Diamant-ATR):  $\tilde{\nu}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3377 (O-H), 3225 (N-H prim., sec.), 2929, 2887 (CH,  $\text{CH}_2$  aliph.), 1662 (N-H prim., sec.), 1519 (Ringschwingung), 858, 817, 787 (=C-H Aromat).

$^{13}\text{C}$ -NMR (MeOH- $d_4$ , 100,6 MHz)  $\delta$  (ppm) = 28,00 (C-8), 47,35 (C-9), 52,70 (C-10), 58,85 (C-17), 67,80 (C-6 a, b), 70,24 (C-7), 71,87 (C-5), 72,12 (C-4), 73,56 (C-2), 75,38 (C-3), 99,90 (C-1), 114,40 (C-16), 116,67 (C-13), 124,40 (C-12), 131,23 (C-11), 148,31 (C-14), 149,45 (C-15).

$^1\text{H}$ -NMR (MeOH- $d_4$ , 600 MHz)  $\delta$  (ppm) = 7,12 (1 H, H-16), 6,96 (1 H, H-12), 6,88 (1 H, H-13), 4,92 (1 H, H-1), 4,08 (2 H, H-10), 3,99 (1 H, H-6), 3,98 (3 H, H-17), 3,90 (1 H, H-5), 3,78 (1 H, H-6), 3,73 (2 H, H-7), 3,72 (1 H, H-3), 3,50 (1 H, H-2), 3,48 (1 H, H-4), 3,05 (2 H, H-9), 2,01 (2 H, H-8).

### **N-(3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxy-benzyl)-3-aminopropylidextran (BHT-5)**

IR (Diamant-ATR):  $\tilde{\nu}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3425 - 3393 (O-H, N-H), 2954, 2867 (CH,  $\text{CH}_2$  aliph.), (N-H prim., sec.), 900 - 800 und 676 (=C-H tetrasubstituierter Aromat).

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm) = 7,33 (2 H, H-12 + 16), 5,17 (1 H, H-1<sub>2-O-subst</sub>), 4,96 (1 H, H-1), 4,25 - 3,31 (6 H + DS \* 2 H, H-2, 3, 4, 5, 6 a, b + H-7), 3,14 (2 H, H-9), 2,00 (2 H, H-8), 1,40 (18 H, H-18).

### **N-Maltitol-aminopropylidextran (G<sub>2</sub>-7)**

IR (Diamant-ATR):  $\tilde{\nu}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3293 (O-H), 3229 (N-H prim., sec.), 2929, 2887 (CH,  $\text{CH}_2$  aliph.), 1650 - 1550 (O-H, N-H prim., sec.), 1004 (C-O).

$^1\text{H}$ -NMR: ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz),  $\delta$  (ppm): 5,45 - 4,80 (H-1 substituiert und unsubstituiert, 5,11 = H-1''), 4,22 - 3,65 (19 H + DS \* 2 H, H-2, 3, 4, 5, 6 a, b, H-3', 5', 6'a, b H-2'', 3'', 4'', 5'', 6'' a, b + H-7), 3,61 (1 H, H-2'), 3,46 (1 H, H-4'), 3,11 (3 H, H-9, H-1'), 2,01 (2 H, H-8).

$^{13}\text{C}$ -NMR: ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100,6 MHz),  $\delta$  (ppm): 107,80 (C-1''), 103,41 (C-1), 84,49 (C-4), 84,44 (C-4'), 82,15 (C-5''), 75,90 - 72,22 (C-5, C-3'', C-2'', C-3, C-2', C-2, C-3', C-4'', C-5', C-7), 65,61 - 63,25 (C-6', C-6, C-6''), 53,47 (C-1'), 48,93 - 48,56 (C-9), 29,81 - 29,76 (C-8).

### **Reduktive Aminierung von APD mit Maltotriose (G<sub>3</sub>)**

$^1\text{H}$ -NMR: ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz),  $\delta$  (ppm): 5,41 - 4,80 (H-1 substituiert und unsubstituiert, 5,39 H-1''', 5,11 = H-1''), 4,14 - 3,59 (16 H + DS \* 2 H, H-2, 3, 4, 5, 6 a, b + H-7 + H-2', 3', 4', 5', 6' a, b + H-2'', 3'', 4'', 5'', 6'' a, b + H-2''', 3''', 4''', 5''', 6''' a, b), 3,11 (3 H, H-9, H-1'), 1,96 (2 H, H-8).

## **Depolymerisation reduktiv aminierter Aminopropylglucane für ESI-MS-Analytik**

### **Hydrolyse (Probe: Bn-3, Van-13 und BHT-5)**

Trifluoressigsäure (900 µL, 2 M) wird zu 1 mg des mittels reduktiver Aminierung (10.3.4) modifizierten Polysaccharids gegeben. Die Hydrolyse wird in einem 1 mL V-Vial für 2 h bei 120 °C durchgeführt. Die Säure wird durch Kodestillation mit Toluol im Stickstoffstrom entfernt.

### **Methanolyse (Probe G<sub>2</sub>-8)**

900 µL methanolische HCl (900 µL, 1,5 M) werden zu 1 mg Probe (G<sub>2</sub>-8) in ein 1 mL V-Vial gegeben. Die Methanolyse wird für 2 h bei 90 °C durchgeführt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird das Reaktionsgemisch mit Methanol unter Stickstoffstrom kodestilliert um die Säure zu entfernen.

## **10.3.5 Nanostrukturierung**

### **10.3.5.1 Synthese von Eisenoxid-Nanopartikeln**

Zu der Lösung aus 3,00 g Eisen(II)chlorid\*4H<sub>2</sub>O und 6,75 mg Eisen(III)chlorid\*6H<sub>2</sub>O (molares Verhältnis 1,0 :1,7) in destilliertem Wasser werden 25 mL Ammoniaklösung (25 %) gegeben. Nach 30 minütigem Erhitzen auf 70 °C und anschließender Abkühlung auf Raumtemperatur wird der Reaktionsansatz für zwei Minuten einer Ultraschallbehandlung unterzogen. Die magnetischen Eisenoxidpartikel werden mithilfe von starken Magneten fixiert und die nichtmagnetischen Reaktionsrückstände werden durch dreimaliges Waschen mit destilliertem Wasser entfernt. Mit verdünnter Salzsäure wird der pH-Wert der Dispersion auf 2,1 bis 2,3 eingestellt.<sup>[183,185,192]</sup>

### **10.3.5.2 Nanostrukturierung der Glucanderivate**

Es werden jeweils 20 mg der Glucanderivate (siehe Kapitel 7) in 5 mL DMSO gelöst und in einen Dialyseschlauch (MWCO 3,5 kDa, Breite 4,5 cm) gegeben. Der Dialyseprozess erfolgt gegen destilliertes Wasser indem über 3 Tage 8 - 10 mal das umgebende Wasser gewechselt wird.<sup>[189]</sup> Bei der Synthese von Partikeln mit magnetischem Kern wird ebenso verfahren, nur dass nach dem Lösen des Polysaccharids eine Eisenpartikeldispersion zugesetzt wird. Nach guter Durchmischung wird gegen destilliertes Wasser dialysiert. Die tabellarische Form der Reaktionsbedingungen mit Mengangaben der Fe-NP-Dispersion befindet sich in Kapitel 7.

### 10.3.5.3 Labeling mit Fluram®

Je 1 mL der jeweiligen Nanopartikeldispersion (Tabelle 7.9) wird mit einer Lösung aus 2 mg (0,0072 mmol) Fluram® in 10 mL Aceton für 15 min geschüttelt. Die Abtrennung des überschüssigen Labelingreagenzes erfolgt durch Dialyse und wird durch Dünnschichtchromatographie überprüft. Die gereinigte Nanopartikeldispersion wird auf einem Objektträger (je 10 Tropfen auf ca. 1 x 1 cm) getrocknet. Danach erfolgt die Untersuchung mit einem Fluoreszenzmikroskop im Hellfeld und mit Filter im Fluoreszenzmodus bei 500-facher Vergrößerung.

**120416-C** IR (Diamant-ATR):  $\tilde{\nu}$  (cm<sup>-1</sup>) = 3368 (O-H), 3239 (N-H prim., sec.), 3053 (=C-H, arom.), 2924, 2839 (CH, CH<sub>2</sub> aliph.), 2248 (C≡N), 1757 (-C=O), 1610 + 1562 (N-H), 1491 + 1462 Ringschwingung, 1281-1199 (-C-O-C), 1013 (C-O), 943-686 (=C-H).

**120416-D** <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 8,09 - 6,83 (8 H, *H*-11 a, b, 12 a, b, 13, 14, 15, 16 aromatische Protonen von Fluram®), 5,40 - 4,67 (1 H, *H*-1, *OH*-4, *OH*-3, *OH*-2), 4,09 - 3,11 (6 H + DS \* 2 H, *H*-2, 3, 4, 5, 6 a, b + OCH<sub>2</sub>), 2,73 (2 H, CH<sub>2</sub>CN).

## 10.4 Derivatisierung von Glucanderivaten für die GC-Analytik

### 10.4.1 Hydrolyse mit Trifluoressigsäure

Es werden ca. 2 mg Glucanderivat in einem 1 mL V-Vial mit 1 mL 2 M TFA versetzt und für 2 h unter gelegentlichem Schütteln im Heizblock bei 120 °C gehalten. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird das Reaktionsgemisch im Stickstoffstrom eingengt und Säurereste werden mittels Kodesstillation mit wenig Toluol entfernt.

### 10.4.2 Reduktion

Der nach Hydrolyse (10.4.1) erhaltene trockene Rückstand wird mit einer frisch angesetzten Lösung aus 5 mg NaBH<sub>4</sub> in 0,5 mL 2 M NH<sub>3</sub> versetzt und für 2 h bei 60 °C reduziert. Überschüssiges NaBH<sub>4</sub> wird durch Zugabe von 6 Tropfen Eisessig hydrolysiert. Das entstandene Borat wird als Borsäure durch Kodesstillation mit 15 %iger methanolischer Essigsäure im Stickstoffstrom entfernt. Der glasige Rückstand wird zur Acetylierung eingesetzt (10.4.3).

### 10.4.3 Acetylierung

Der nach Reduktion (10.4.2) erhaltene Rückstand wird mit 50  $\mu\text{L}$  Pyridin und 200  $\mu\text{L}$  Acetanhydrid versetzt und für 2 h bei 90 °C unter wiederholtem Schütteln umgesetzt. Anschließend wird der Ansatz im Stickstoffstrom bis kurz vor Erreichen der Trockne eingengt. Im Anschluss werden die Alditolacetate wie folgt extrahiert: Im ersten Schritt wird mit gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung in ein 5 mL V-Vial überführt. Es wird so viel Lauge hinzugefügt, bis keine  $\text{CO}_2$ -Gasentwicklung mehr erkennbar ist. Anschließend wird dreimal mit jeweils 1 mL Dichlormethan extrahiert und die vereinten organischen Phasen werden einmal mit 1 mL gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung, 1 mL kalter 0,1 M HCl sowie dreimal mit 1 mL destilliertem Wasser gewaschen. Die organische Phase wird mit  $\text{CaCl}_2$  getrocknet. Das Trockenmittel wird entfernt, das Lösungsmittel verdampft und die Alditolacetate werden in 1 mL Dichlormethan aufgenommen. Nach Verdünnung mit Dichlormethan ( $c \sim 0,1 \text{ mg/mL}$ ) ist die Lösung für die gaschromatographische Analyse einsatzbereit.

### 10.4.4 Methanolyse

Es werden 1-1,5 mg Glucanderivat in einem 1 mL V-Vial mit 1 mL 1,5 M methanolischer HCl versetzt und bei 90 °C für 90 min unter gelegentlichem Schütteln im Heizblock umgesetzt. Im Anschluss werden die Säurereste durch fünfmalige Kodestillation mit Methanol im Stickstoffstrom entfernt. Die erhaltenen Methylglucoside werden dann einer Trimethylsilylierung unterworfen (10.4.5).

Zur Herstellung der 1,5 M methanolischen HCl werden 8 mL Acetylchlorid (puriss) zu 67 mL eisgekühltem, trockenem Methanol (SeccoSolv®) getropft. Die Lösung wird im Kühlschrank aufbewahrt und wurde maximal einen Monat verwendet.

### 10.4.5 Trimethylsilylierung

Der nach Methanolyse (10.4.4) erhaltene, trockene Rückstand wird mit 5  $\mu\text{L}$  Pyridin, 100  $\mu\text{L}$  (BSTFA) und 10  $\mu\text{L}$  Trimethylchlorsilan (TMSCl) versetzt, wobei die Reaktionsgefäße nicht zu lange geöffnet stehen dürfen, um Wassereintrag aus der Umgebungsluft zu vermeiden. Der Reaktionsansatz wird bei 100 °C für 1 h im Heizblock erhitzt und gelegentlich geschüttelt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur werden die Proben im Stickstoffstrom getrocknet, in 1 mL Dichlormethan aufgenommen und vor der gaschromatographischen Analyse 1 : 10 mit diesem Lösungsmittel verdünnt.

### 10.4.6 Methyl- und Ethylglucane

Für die gaschromatographische Analyse der Methyl- und Ethylglucane (Kapitel 3) werden diese mittels Hydrolyse bzw. Methanolyse in ihre Monomereinheiten gespalten und in Alditolacetate (10.4.1 bis 10.4.3) bzw. Trimethylsilylderivate (10.4.4 bis 10.4.5) überführt. Die Peakzuordnung erfolgt über GC/MS-Spektren.<sup>[49]</sup>

#### Responsefaktoren:

Für Methylglucane nach Methanolyse und Trimethylsilylierung:

un-  $\equiv$  0,4873, mono- 0,5878, di- 0,7404, tri- 1,000 und tetrasubstituiert 1,540.

Für Methylglucane nach Hydrolyse, Reduktion, Acetylierung:

un-  $\equiv$  0,837, mono- 0,882 bzw. 0,892 in Position 6, di- 0,931 bzw. 0,943 in Position 6, tri- 0,987 bzw. 1,000 in Position 6 und tetrasubstituiert 1,064.

Für Ethylglucane nach Hydrolyse, Reduktion, Acetylierung:

un-  $\equiv$  1,124, mono- 1,058 bzw. 1,070 in Position 6, di- 1,000 bzw. 1,010 in Position 6, tri- 0,948 bzw. 0,957 in Position 6 und tetrasubstituiert 0,909.

### 10.4.7 Cyanoethylglucane

Die Cyanoethylderivate werden mittels saurer Hydrolyse (10.4.1) in Monomereinheiten gespalten und dann trimethylsilyliert (10.4.5). Es werden 900  $\mu$ L 1,5 M TFA eingesetzt ansonsten entspricht die Vorgehensweise der für Methyl- und Ethylglucane beschriebenen. Die Signalzuordnung erfolgte über GC/MS-Spektren aus den Arbeiten von Gonera.<sup>[127,128]</sup>

#### Responsefaktoren:

Substituent:  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-CN}$

un-  $\equiv$  1,0000, mono- 1,0694, di- 1,1491, und trisubstituiert 1,2416; Carboxyethyl-TMS-Ester (Hydrolysenebenprodukte der Nitrilgruppen): mono- 0,9250, di- 0,9840 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOTMS/CE}$ ), 0,8605 ( $2 \times \text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOTMS}$ ), trisubstituiert 1,0511 ( $2 \times \text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOTMS/CE}$ ).



## **11 Anhang**

## 11.1 Substituentenverteilung von Alkyldextranen und -pullulanen

Reaktionsbedingungen siehe Tabelle 3.1 bis 3.3, Kapitel 3.

### Gaschromatographisch als Alditolacetate bestimmte Monomierzusammensetzung der Methyl-dextrane

		D-1	D-2	D-3	D-4	D-14	D-15	D-16	D-17	D-18-1	D-18-2	D-19-1	D-19-2	D-20-1	D-20-2	D-21-1	D-21-2
<b>Monomer- zusammen- setzung [Mol-%]</b>	$s_0$	45,45	15,28	15,21	8,56	3,81	1,81	2,08	4,31	76,96	69,34	49,22	64,84	74,87	72,04	60,88	50,99
	$s_2$	24,19	19,53	16,51	12,11	6,13	5,89	5,19	6,64	16,00	20,36	31,97	23,52	17,12	18,42	25,79	30,90
	$s_3$	6,81	5,85	4,61	3,37	1,38	1,33	1,16	1,45	1,77	2,24	3,19	2,47	1,93	2,13	2,59	2,92
	$s_4$	6,31	4,52	3,69	2,74	1,33	1,45	1,40	2,41	3,31	4,08	5,95	4,48	3,48	3,90	4,92	5,67
	$s_{23}$	7,93	17,53	15,89	17,23	9,33	11,01	10,24	10,29	0,48	1,37	2,21	1,10	0,75	1,06	1,42	2,16
	$s_{24}$	2,75	11,00	6,69	11,25	16,54	18,46	16,17	13,93	0,83	1,47	4,35	2,06	0,96	1,43	2,58	4,12
	$s_{34}$	2,50	6,83	6,16	6,99	10,27	11,47	10,04	8,65	0,52	0,91	2,70	1,28	0,60	0,89	1,60	2,56
	$s_{234}$	4,06	19,47	30,93	37,75	51,20	48,58	53,73	52,32	0,13	0,24	0,41	0,25	0,29	0,13	0,22	0,67
<b>Anteile un-, mono-, di- und trisubstituierter Glc</b>	$c_0$	45,45	15,28	15,21	8,56	3,81	1,81	2,08	4,31	76,96	69,34	49,22	64,84	74,87	72,04	60,88	50,99
	$c_1$	37,31	29,89	24,81	18,22	8,85	8,67	7,75	10,50	21,07	26,68	41,11	30,47	22,53	24,45	33,30	39,49
	$c_2$	13,18	35,36	28,75	35,47	36,15	40,94	36,44	32,87	1,83	3,75	9,25	4,44	2,31	3,39	5,61	8,85
	$c_3$	4,06	19,47	30,93	37,75	51,20	48,58	53,73	52,32	0,13	0,24	0,41	0,25	0,29	0,13	0,22	0,67
<b>Partielle DS-Werte</b>	$x_2$	0,39	0,68	0,70	0,78	0,83	0,84	0,85	0,83	0,17	0,23	0,39	0,27	0,19	0,21	0,30	0,38
	%	51,3	42,5	40,0	38,7	35,5	35,5	35,3	35,7	69,4	67,2	64,0	67,2	68,3	66,6	66,5	64,0
	$x_3$	0,21	0,50	0,58	0,65	0,72	0,72	0,75	0,73	0,03	0,05	0,09	0,05	0,04	0,04	0,06	0,08
	%	28,1	31,2	32,9	32,3	30,8	30,6	31,1	31,2	11,5	13,7	14,0	12,7	12,7	13,3	12,9	14,0
	$x_4$	0,16	0,42	0,47	0,59	0,79	0,80	0,81	0,77	0,05	0,07	0,13	0,08	0,05	0,06	0,09	0,13
	%	20,6	26,3	27,1	29,0	33,8	33,8	33,6	33,2	19,1	19,2	22,0	20,1	19,0	20,1	20,6	22,0
	$DS_{ges}$	0,78	1,62	1,78	2,06	2,38	2,41	2,46	2,37	0,25	0,35	0,40	0,61	0,28	0,32	0,45	0,60
	$DS_{06}$	0,76	1,59	1,75	2,03	2,35	2,36	2,42	2,33	0,25	0,35	0,40	0,61	0,28	0,32	0,45	0,59
	$H_1$	0,97	1,22	2,27	1,47	0,82	0,51	0,48	1,06	0,13	0,26	0,41	0,26	0,20	0,25	0,29	0,44

$DS_{06}$ : DS ohne terminale 6-O-Substitution; D-1 bis D-4: Zweifachbestimmungen, D-14 bis D-17: Dreifachbestimmungen, D-18-1 bis D-21-2 Einfachbestimmung.

# Gaschromatographisch bestimmte Monomerzusammensetzung der Methyl-dextrane nach Methanolyse und Trimethylsilylierung

		D-1	D-2	D-3	D-4	D-14	D-15	D-16	D-17	D-18-1	D-18-2	D-19-1	D-19-2	D-20-1	D-20-2	D-21-1	D-21-2
<b>Monomer- zusammen- setzung [Mol-%]</b>	$s_0$	46,87	16,58	16,72	11,06	5,25	1,69	2,22	5,67	80,84	75,30	70,46	60,99	82,48	76,01	68,87	60,80
	$s_2$	20,25	17,36	14,43	11,49	8,40	5,14	4,29	7,45	15,45	19,32	21,48	28,43	14,17	18,03	24,41	30,33
	$s_3$	8,03	7,15	6,67	4,66	2,57	0,92	1,56	2,15	2,20	2,97	4,16	4,25	2,15	3,51	3,07	2,45
	$s_4$	8,15	5,98	5,83	4,21	1,73	1,34	1,24	3,03	0,15	0,22	0,38	0,89	0,11	0,35	0,10	0,14
	$s_{23}$	4,38	12,29	11,41	13,08	11,85	10,77	10,48	11,13	0,41	0,69	1,32	1,75	0,35	0,70	1,13	2,01
	$s_{24}$	5,54	13,07	12,10	12,84	15,84	13,43	12,72	8,88	0,70	1,15	1,61	3,06	0,61	1,08	2,03	3,57
	$s_{34}$	2,22	5,92	5,42	5,52	4,38	4,24	4,30	6,00	0,16	0,21	0,38	0,41	0,12	0,25	0,28	0,43
	$s_{234}$	4,57	21,64	27,42	37,14	49,96	62,47	63,20	55,70	0,09	0,15	0,21	0,22	0,02	0,07	0,12	0,27
<b>Anteile un-, mono-, di- und trisubstituierter Glc</b>	$c_0$	46,87	16,58	16,72	11,06	5,25	1,69	2,22	5,67	80,84	75,30	70,46	60,99	82,48	76,01	68,87	60,80
	$c_1$	36,43	30,49	26,93	20,36	12,71	7,40	7,09	12,62	17,79	22,51	26,02	33,57	16,42	21,88	27,58	32,92
	$c_2$	12,14	31,28	28,94	31,44	32,07	28,44	27,50	26,01	1,27	2,05	3,31	5,22	1,08	2,04	3,43	6,01
	$c_3$	4,57	21,64	27,42	37,14	49,96	62,47	63,20	55,70	0,09	0,15	0,21	0,22	0,02	0,07	0,12	0,27
<b>Partielle DS-Werte</b>	$x_2$	0,35	0,64	0,65	0,75	0,86	0,92	0,91	0,83	0,17	0,21	0,25	0,33	0,15	0,20	0,28	0,36
	%	46,7	40,7	39,1	38,3	38,0	36,5	36,0	35,9	80,8	78,7	74,0	74,9	81,2	76,1	79,6	79,2
	$x_3$	0,19	0,47	0,51	0,60	0,69	0,78	0,80	0,75	0,03	0,04	0,06	0,07	0,03	0,05	0,05	0,05
	%	25,8	29,8	30,5	31,0	30,3	31,2	31,6	32,4	13,9	14,9	18,2	14,8	14,2	17,2	13,2	11,1
	$x_4$	0,20	0,47	0,51	0,60	0,72	0,81	0,81	0,74	0,01	0,02	0,03	0,05	0,01	0,02	0,03	0,04
	%	27,5	29,5	30,4	30,7	31,7	32,4	32,4	31,8	5,3	6,4	7,8	10,3	4,6	6,7	7,3	9,7
	$DS_{ges}$	0,77	1,60	1,71	1,98	2,31	2,56	2,56	2,35	0,21	0,28	0,34	0,45	0,19	0,27	0,35	0,46
	$DS_{06}$	0,74	1,58	1,67	1,95	2,27	2,52	2,52	2,32	0,21	0,27	0,33	0,45	0,19	0,26	0,35	0,46
	$H_1$	0,89	1,47	1,97	1,86	1,35	0,72	0,81	1,78	0,17	0,24	0,33	0,43	0,13	0,21	0,38	0,65

$DS_{06}$ : DS ohne terminale 6-O-Substitution; Zweifachbestimmungen.

Gaschromatographisch bestimmte Monomerzusammensetzung der Methylpullulane als Alditolacetate und als O-TMS-Derivate.

HRA		P-9	P-10	P-11	P-12
Monomer- zusammen- setzung [Mol-%]	$S_0$	34,99	6,17	0,81	0,13
	$S_2$	40,32	33,92	6,77	2,19
	$S_3$	3,76	2,72	0,99	0,22
	$S_4$	0,50	0,63	0,16	0,06
	$S_6$	2,24	3,31	0,45	0,39
	$S_{23}$	4,77	11,64	9,83	6,65
	$S_{24}$	1,65	5,69	6,43	3,47
	$S_{26}$	5,50	19,76	18,84	11,13
	$S_{34}$	0,65	2,26	2,55	1,38
	$S_{36}$	0,62	1,54	1,65	0,68
	$S_{234}$	2,82	4,79	15,33	21,82
	$S_{236}$	2,19	7,58	36,19	51,88
Anteile un-, mono-, di- und trisubstituierter Glc	$C_0$	34,99	6,17	0,81	0,13
	$C_1$	46,82	40,59	8,37	2,85
	$C_2$	13,19	40,88	39,31	23,31
	$C_3$	5,01	12,37	51,51	73,71
Partielle DS-Werte	$x_2$	0,57	0,83	0,93	0,97
	%	64,9	52,3	38,7	35,9
	$x_3$	0,15	0,31	0,67	0,83
	%	16,8	19,1	27,6	30,5
	$x_4$	0,06	0,13	0,24	0,27
	%	6,3	8,4	10,1	9,9
	$x_6$	0,11	0,32	0,57	0,64
	%	12,0	20,2	23,6	23,7
	DS	0,88	1,60	2,42	2,71
	$H_1$	0,54	0,41	0,27	0,16

Dreifachbestimmungen.

Meglc/O-TMS		P-9	P-10	P-11	P-12
Monomer- zusammen- setzung [Mol-%]	$S_0$	40,19	7,34	0,85	0,09
	$S_2$	38,56	32,94	7,42	2,41
	$S_3$	3,29	3,76	1,07	0,32
	$S_4$	0,63	0,81	0,21	0,03
	$S_6$	2,19	2,76	0,28	0,10
	$S_{23}$	4,31	12,48	10,88	7,52
	$S_{24}$	1,44	5,57	5,80	3,16
	$S_{26}$	6,09	18,92	19,36	11,30
	$S_{34}$	0,30	1,68	2,35	1,84
	$S_{36}$	0,58	2,08	1,84	0,92
	$S_{234}$	0,77	3,96	17,08	24,50
	$S_{236}$	1,65	7,70	32,87	47,81
Anteile un-, mono-, di- und trisubstituierter Glc	$C_0$	44,67	40,27	8,98	2,86
	$C_1$	12,72	40,73	40,23	24,74
	$C_2$	2,42	11,66	49,95	72,31
	$C_3$	0,00	0,00	0,00	0,00
Partielle DS-Werte	$x_2$	0,53	0,82	0,93	0,97
	%	68,2	52,0	39,0	35,9
	$x_3$	0,11	0,32	0,66	0,83
	%	14,1	20,2	27,6	30,8
	$x_4$	0,03	0,12	0,25	0,30
	%	4,1	7,7	10,7	11,0
	$x_6$	0,11	0,31	0,54	0,60
	%	13,6	20,1	22,7	22,3
	DS	0,77	1,57	2,39	2,70
	$H_1$	0,45	0,32	0,36	0,24

## 11.2 Substituentenverteilung von Ethyldextranen und -pullulanen

Gaschromatographisch als Alditolacetate bestimmte Monomierzusammensetzung der Ethylglucane (vergleiche Tabelle 3.1, Kapitel 3)

Ethyldextran		D-5	D-6	D-7	Ethylpullulan		P-5	P-7	P-8
Monomer- zusammen- setzung [Mol-%]	$s_0$	69,69	50,44	21,55	Monomer- zusammen- setzung [Mol-%]	$s_0$	72,5	12,79	10,23
	$s_2$	13,85	16,74	20,56		$s_2$	20,59	34,18	32,51
	$s_3$	3,24	3,39	2,95		$s_3$	0,78	1,61	0,97
	$s_4$	4,69	5,1	4,63		$s_4$	0,44	0,67	0,64
	$s_{23}$	0,1	5,85	11,81		$s_6$	1,27	3,89	3,18
	$s_{24}$	2,47	6,42	11,16		$s_{23+} s_{34}$	1,31	8,51	10,92
	$s_{34}$	3,22	0	0		$s_{24}$	0,29	4,03	3,45
	$s_{234}$	2,75	12,05	27,34		$s_{26}$	1,5	17,03	16,65
Anteile un-, mono-, di- und trisubstituierter Glc	$c_0$	69,69	50,44	21,55	Anteile un-, mono-, di- und trisubstituierter Glc	$s_{36}$	0,07	0,87	0,58
	$c_1$	21,78	25,24	28,14		$s_{234}$	0,63	7,23	10,16
	$c_2$	5,79	12,27	22,97		$s_{236}$	0,61	9,2	10,71
	$c_3$	2,75	12,05	27,34		$c_0$	3,18	30,5	31,59
Partielle DS-Werte	$x_2$	0,19	0,41	0,71	Partielle DS-Werte	$c_1$	1,24	16,24	20,87
	%	46,1	47,8	45,4		$c_2$	0,25	0,8	0,84
	$x_3$	0,09	0,21	0,42		$c_3$	75,21	53,36	51,74
	%	22,4	24,8	27,0		$x_2$	0,03	0,27	0,33
	$x_4$	0,13	0,24	0,43		%	10,3	18,2	20,4
	%	31,6	27,4	27,6		$x_3$	0,01	0,12	0,14
	$DS_{ges}$	0,43	0,88	1,58		%	4,1	7,9	8,7
	$DS_{06}$	0,42	0,86	1,56		$x_4$	0,03	0,31	0,31
	$H_1$	1,14	2,71	2,74		%	10,4	20,6	19,1
						$x_6$	0,33	1,51	1,63
						%	0,4	0,7	0,9
						DS	0,33	1,51	1,63
						$H_1$	0,4	0,73	0,89

Einfachbestimmungen.

## 11.3 Substituentenverteilung von Cyanoethyldextranen und -pullulanen

Reaktionsbedingungen siehe Tabelle 4.1 Kapitel 4.

### Gaschromatographisch bestimmte Monomerzusammensetzung von Cyanoethyldextranen nach Hydrolyse und Trimethylsilylierung

		CED-1	CED-2	CED-3	CED-4	CED-5	CED-6	CED-8	CED-9	CED-10	CED-11	CED-12	CED-19	CED-20	CED-21
<b>Monomer- zusammen- setzung [Mol-%]</b>	$s_0$	13,51	14,35	18,77	13,10	43,20	2,29	69,98	14,97	3,43	15,48	19,17	28,43	15,98	2,70
	$s_2$	22,56	22,29	24,65	21,85	24,61	2,92	15,10	21,76	3,75	16,89	17,60	26,06	23,86	4,06
	$s_3$	5,31	5,18	5,69	5,07	4,85	2,65	3,68	5,39	5,08	6,49	7,53	5,01	6,29	4,98
	$s_4$	11,59	11,27	12,14	10,72	11,86	3,38	7,98	12,19	4,85	13,37	13,38	12,97	14,45	4,30
	$s_{23}$	11,49	11,53	9,78	11,99	4,02	13,58	0,93	11,41	15,08	13,16	11,72	7,22	11,28	16,68
	$s_{24}$	23,41	22,90	19,46	24,12	8,46	6,80	1,71	21,36	5,39	16,78	14,06	13,20	14,12	5,39
	$s_{34}$	4,49	4,48	3,99	4,54	1,80	15,39	0,55	4,46	19,42	6,94	6,69	2,77	9,29	16,37
	$s_{234}$	7,63	8,01	5,51	8,61	1,20	52,99	0,06	8,46	43,00	10,89	9,84	4,33	4,73	45,52
<b>Anteile un-, mono-, di- und trisubstituierter Glc</b>	$c_0$	13,51	14,35	18,77	13,10	43,20	2,29	69,98	14,97	3,43	15,48	19,17	28,43	15,98	2,70
	$c_1$	39,47	38,74	42,48	37,64	41,31	8,95	26,77	39,34	13,68	36,76	38,51	44,05	44,60	13,35
	$c_2$	39,39	38,90	33,23	40,65	14,28	35,78	3,20	37,23	39,89	36,87	32,48	23,19	34,69	38,44
	$c_3$	7,63	8,01	5,51	8,61	1,20	52,99	0,06	8,46	43,00	10,89	9,84	4,33	4,73	45,52
<b>Partielle DS-Werte</b>	$x_2$	0,65	0,65	0,59	0,67	0,38	0,76	0,18	0,63	0,67	0,58	0,53	0,51	0,54	0,72
	%	46,1	46,0	47,3	46,0	52,1	31,9	53,4	45,3	30,2	40,3	40,0	49,5	42,2	31,6
	$x_3$	0,29	0,29	0,25	0,30	0,12	0,85	0,05	0,30	0,83	0,37	0,36	0,19	0,32	0,84
	%	20,5	20,8	19,9	20,9	16,2	35,3	15,7	21,4	37,1	26,2	26,9	18,5	24,6	36,8
	$x_4$	0,47	0,47	0,41	0,48	0,23	0,79	0,10	0,46	0,73	0,48	0,44	0,33	0,43	0,72
	%	33,4	33,2	32,8	33,1	31,7	32,8	30,9	33,3	32,7	33,5	33,1	32,0	33,2	31,6
	DS	1,41	1,41	1,25	1,45	0,74	2,40	0,34	1,39	2,17	1,43	1,33	1,04	1,28	2,27
	$H_1$	0,40	0,42	0,31	0,46	0,30	0,51	0,08	0,39	0,65	0,50	0,51	0,38	0,89	0,61

Daten ohne Hydrolyseprodukte der CE-Gruppen; Zweifachbestimmungen, außer: Dreifachbestimmungen: 10, 11 und 6, Einfachbestimmung: 20.

# Gaschromatographisch bestimmte Monomerzusammensetzung von Cyanoethylpullulanen nach Hydrolyse und Trimethylsilylierung

		CEP-9	CEP-11	CEP-12	CEP-13	CEP-14	CEP-15	CEP-16	CEP-17	CEP-19	CEP-20
<b>Monomer- zusammen- setzung [Mol-%]</b>	$s_0$	57,32	55,28	54,30	53,20	54,27	61,51	55,83	0,49	37,90	11,32
	$s_2$	15,73	11,40	7,65	5,64	4,63	20,48	21,92	1,05	25,39	11,82
	$s_3$	3,89	3,76	3,19	2,89	2,72	3,95	4,49	0,88	4,28	3,52
	$s_4$	4,12	5,53	5,24	5,12	5,19	2,75	3,29	1,26	3,65	6,86
	$s_6$	11,77	17,32	19,53	24,27	25,07	7,43	9,36	6,63	9,02	13,98
	$s_{23}$	1,47	0,85	1,01	0,65	0,46	0,68	0,85	3,69	2,94	7,03
	$s_{24}$	0,90	0,66	0,55	0,27	0,18	0,70	0,87	1,12	2,97	5,23
	$s_{26}$	2,74	3,33	3,83	3,45	3,00	1,33	1,90	15,07	6,28	19,66
	$s_{34}$	0,96	0,59	3,30	3,28	3,51	0,60	0,65	6,54	4,20	5,26
	$s_{36}$	1,10	1,28	1,40	1,22	0,96	0,58	0,84	10,14	1,62	4,81
	$s_{234}$	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	16,53	0,33	3,34
	$s_{236}$	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	36,60	1,41	7,17
<b>Anteile un-, mono-, di- und trisubstituierter Glc</b>	$c_0$	57,32	55,28	54,30	53,20	54,27	61,51	55,83	0,49	37,90	11,32
	$c_1$	35,50	38,01	35,62	37,92	37,61	34,61	39,05	9,82	42,35	36,17
	$c_2$	7,18	6,71	10,08	8,88	8,12	3,88	5,11	36,55	18,01	41,99
	$c_3$	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	53,14	1,74	10,51
<b>Partielle DS-Werte</b>	$x_2$	0,21	0,16	0,13	0,10	0,08	0,23	0,26	0,74	0,39	0,54
	%	41,8	31,6	23,4	18,0	15,3	54,7	51,8	30,6	47,1	35,8
	$x_3$	0,07	0,06	0,09	0,08	0,08	0,06	0,07	0,74	0,15	0,31
	%	14,9	12,6	15,9	14,5	14,2	13,7	13,9	30,7	17,7	20,5
	$x_4$	0,06	0,07	0,09	0,09	0,09	0,04	0,05	0,25	0,11	0,21
	%	12,0	13,2	16,3	15,5	16,5	9,6	9,8	10,5	13,3	13,6
	$x_6$	0,16	0,22	0,25	0,29	0,29	0,09	0,12	0,68	0,18	0,46
	%	31,3	42,6	44,4	52,0	54,0	22,0	24,5	28,2	21,9	30,1
	DS	0,50	0,51	0,56	0,56	0,54	0,42	0,49	2,42	0,84	1,52
	$H_1$	0,11	0,08	0,37	0,36	0,39	0,19	0,28	0,55	0,43	0,43

Daten ohne Hydrolyseprodukte der CE-Gruppen; Einfachbestimmungen außer: Zweifachbestimmungen: 15, 17, 19 20, 21.

## 12 Abkürzungsverzeichnis

A	Auswaage
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AGU	Anhydroglucose Unit , Anhydroglucoseeinheit
AP	Aminopropyl
ATR	Attenuated Total Reflection, Abgeschwächte Totalreflexion
BHT-CHO	3,5-Di- <i>tert</i> -butyl-4-hydroxybenzaldehyde
Bn	Benzaldehyd
BSTFA	<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
CA	Celluloseacetat
CCD	Charge-coupled Device
CE	Cyanoethyl
$\delta$	relative Verschiebung zu TMS [ppm]
d	Durchmesser
D	Dextran
dest.	entmineralisiertes („destilliertes“) Wasser
DC	Dünnschichtchromatographie
DLS	Dynamic Light Scattering, Dynamische Lichtstreuung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DP	Degree of Polymerisation, Polymerisationsgrad
$D_{red}$	Degree of Reduction, Reduktionsgrad
$DS_{(x)}$	Degree of Substitution, Substitutionsgrad, ggf. mit x = Bestimmungsmethode, oder Abkürzung des Substituenten
E	Einwaage
EELS	Electron Energy Loss Spectroscopy, Elektronen-Energieverlust- spektroskopie
ECR	Effective Carbon Response
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ESI-MS	Elektrosprayionisation-Massenspektrometrie
Et	Ethyl
eq	Äquivalent/-e
FeNP	magnetische Eisenoxid-Nanopartikel-Dispersion
FID	Flammenionisationsdetektor
FTIR	Fourier-Transformations-IR-Spektroskopie
$G_2$	Maltose
$G_3$	Maltotriose
GC	Gaschromatograph/-ie
Glc	Glucose
H	Stunde/-n
GLC	Gas Liquid Chromatography, Gasflüssigkeitschromatographie
$H_1$	Heterogenitätsparameter (Monomere)
$H_c$	Koerzitivfeldstärke
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum correlation



HRA	Derivatisierung zu Alditolacetaten (Hydrolyse, Reduktion, Acetylierung)
ICP-OES	Inductively Coupled Optical Emission Spectroscopy
IR	Infrarot
Li-Dimsyl	Li-Methylsulfinylmethanid
MALS	Multiple Angle Light Scattering, statische Lichtstreuung
Me	Methyl
Meglc/OTMS	silylierte Methylglucoside
MFH	Magnetic Fluid Hyperthermia, Magnet-Flüssigkeits Hyperthermie
min	Minute/n
MPI	Magnetic Particle Imaging
MPS	Magnetpartikelspektroskopie
MRI	Magnetic resonance imaging
MRX	Magnetrelaxometrie
MS	Massenspektrometrie
MWCO	Molecular Weight Cut Off
NMR	Nuclear Magnetic Resonance, Kernresonanzspektroskopie
p.a.	pro analysis
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
P	Pulluan
PEELS	Parallel Electron Energy Loss Spectroscopy, parallele Elektronen-Energieverlustspektroskopie
PdI	Polydispersität
PS	Polysaccharid
QUELS	Quasielastische Lichtstreuung
REM	Rasterelektronenmikroskop/-ie
RG	Gyrationsradius (Trägheitsradius)
RT	Raumtemperatur (20-24 °C)
s	Standardabweichung
SE	Sekundärelektron/-en
SEM	Scanning Electron Microscope/-y, Rasterelektronenmikroskop/-ie
Tab	Tabelle
TM	Trockenmasse
TEM	Transmission Electron Microscope/-y, Transmissionselektronen mikroskop/-ie
TFA	Trifluoressigsäure, Trifluoracetyl-
TMSCI	Trimethylchlorsilan
TMS	Trimethylsilyl, Tetramethylsilan (NMR-Referenz)
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
un	unsubstituiert
Van	Vanillin

## 13 Literaturverzeichnis

1. Varki, A.; Cummings, R.; Esko, J.; Freeze, H.; Hart, G.; Marth, J. *Essentials of Glycobiology*, 6th ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, **1999**.
2. Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 5th ed.; Springer: Berlin, **2008**.
3. Na, K.; Bae, Y. H. *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 681-688.
4. Na, K.; Lee, E. S.; Bae, Y. H. *J. Controlled Release* **2003**, *87*, 3-13.
5. De Geest, B. G.; Van Camp, W.; Du Prez, F. E.; De Smedt, S. C.; Demeester, J.; Hennink, W. E. *Chem. Commun.* **2008**, 190-192.
6. Kuroda, K.; Fujimoto, K.; Sunamoto, J.; Akiyoshi, K. *Langmuir* **2002**, *18*, 3780-3786.
7. Seo, J. H.; Kim, C. S.; Hwang, B. H.; Cha, H. J. *Nanotechnology* **2010**, *21*, 215101.
8. Xiong, Z.-G.; Li, J.-P.; Tang, L.; Chen, Z.-Q. *Chinese J. Anal. Chem.* **2010**, *38*, 800-804.
9. Hornig, S.; Biskup, C.; Gräfe, A.; Wotschadlo, J.; Liebert, T.; Mohr, G. J.; Heinze, T. *Soft Matter* **2008**, *4*, 1169-1172.
10. Gupta, M.; A. K. Gupta, A. K. *J. Controlled Release* **2004**, *99*, 157-166.
11. Aumelas, A.; Serrero, A.; Durand, A.; Dellacherie, E.; Leonard, M. *Colloids Surf., B* **2007**, *59*, 74-80.
12. Berry, C. C.; Curtis A. S. G. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2003**, *36*, 198-206.
13. Sozer, N.; Kokini, J. L. *Trends Biotechnol.* **2009**, *27*, 82-89.
14. McCarthy, J. R.; Weissleder, R. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 1241-1251.
15. Leathers D. Pullulan. In *Biopolymers: Biology, Chemistry, Biotechnology, Applications*, De Beats, S.; Vandamme, E. J.; Steinbüchel, A., Eds.; Wiley-VCH, **2003**, Vol. 6.
16. Marsh, P. B.; Bollenbacher, K. *Text. Res. J.* **1949**, *19*, 462-484.
17. Bernier, B. *Can. J. Microbiol.* **1958**, *4*, 195-204.
18. Bender, H.; Lehmann, J.; Wallenfels, K. *Biochim. Biophys. Acta* **1959**, *36*, 309-316.
19. Wallenfels, K.; Bender, H.; Keilich, G.; Bechtler, G. *Angew. Chem.* **1961**, *73*, 245-246.
20. Wallenfels, K.; Bechtler, G.; Kuhn, R.; Trischmann, H.; Egge, H. *Angew. Chem.* **1963**, *75*, 1014-1022.
21. Wallenfels, K.; Rached, I. R.; Hucho, F. *Eur. J. Biochem.* **1969**, *7*, 231-233.
22. Catley, B. J.; Robyt, J. R.; Whelan, W. J. *Biochem.* **1966**, *100*, 5-6.
23. Jakovljevic, D.; Vrvic, M. M.; Radulovic, M.; Hranisavljevic-Jakovljevic, M. *J. Serb. Chem. Soc.* **2001**, *66*, 377-383.
24. Yun, J. W.; Lee, M. G.; Song, S. K. *Biotechnol. Lett* **1994**, *16*, 1145-1150.
25. Yun, J. W.; Lee, M. G.; Song, S. K. *Biotechnol. Lett* **1994**, *16*, 359-362.
26. Sandford, P. A. Exocellular, Microbial Polysaccharides. In *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, Tipson, R.S.; Horton, D., Eds.; Academic Press, **1979**, Vol. 36, 265-313.
27. Seviour, R. J.; Stasinopoulos, S. J.; Auer, D. P. F.; Gibbs, P. A. *Crit. Rev. Biotechnol.* **1992**, *12*, 279-298.
28. Reeslev, M.; Jørgensen, B. B.; Jørgensen, O. B. *J. Biotechnol.* **1996**, *51*, 131-135.
29. Gaisser, S.; Hoogeveen, R.; Hüsing, B., *Überblick über den Stand von Wissenschaft und Technik im produktionsintegrierten Umweltschutz durch Biotechnologie (PIUS-BT); Fraunhofer Institut Systemtechnik und Innovationsforschung; Im Auftrag des Ministeriums für Umwelt und Verkehr Baden-Württemberg*, **2002**.
30. Singh, R. S.; Saini, G. K.; Kennedy, J. F. *Carbohydr. Polym.* **2008**, *73*, 515-531.

31. EFSA, *Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to Pullulan PI-20 for use as a new food additive*; Question number EFSA-Q-2003-138; The EFSA Journal **2004**, 85, 1-35.
32. Leathers, T. D. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, 62, 468-473.
33. Taniguchi, M.; Kawai, T. *Appl. Phys. Lett.* **2004**, 85, 3298-3300.
34. Zhang, H.-Z.; Gao, F. P.; Liu L.-R.; Li, X.-M.; Zhou, Z.-M.; Yang, X.-D.; Zhang, Q.-Q. *Colloids Surf., B* **2009**, 71, 19-26.
35. Shingel, K. I. *Carbohydr. Res.* **2004**, 339, 447-460.
36. Scheibler, C. *Zeitschrift des Vereins für die Rübenzuckerindustrie des deutschen Reiches* **1874**, 24, 309-335.
37. Larm, O.; Lindberg, B.; Svensson, S. *Carbohydr. Res.* **1971**, 20, 39-48.
38. Rolland-Sabaté, A.; Mendez-Montealvo, M. G.; Colonna, P.; Planchot, V. *Biomacromolecules* **2008**, 9, 1719-1730.
39. Fahner, E. M.; Großmann, G. H.; Ebert, K. H. *Makromol. Chem.* **1984**, 185, 2205-2212.
40. Van Dijk, M.; Rijkers, D. T. S.; Liskamp, R. M. J.; Van Nostrum, C. F.; Hennink, W. E. *Bioconjugate Chem.* **2009**, 20, 2001-2016.
41. Brøndsted, H.; Andersen, C.; Hovgaard, L. *J. Controlled Release* **1998**, 53, 7-13.
42. De Belder, A. N., Medical Applications of Dextran and its Derivatives. In *Medical Applications* New York, **1996**.
43. Liebert, T.; Hornig, S.; Hesse, S.; Heinze, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 10484-10485.
44. Hornig, S.; Heinze, T.; Hesse, S.; Liebert, T. *Macromol. Rapid Commun.* **2005**, 26, 1908-1912.
45. Capon, B. *Chem. Rev.* **1969**, 69, 407-498.
46. Koschella, A.; Fenn, D.; Illy, N.; Heinze, T., *Macromol. Symp.* **2006**, 244, 59-73.
47. Hakomori, S.-I. *J. Biochem. (Tokyo)* **1964**, 55, 205-208.
48. Mischnick, P.; Momcilovic, D. Chemical Structure Analysis of Starch and Cellulose Derivatives. In *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, Derek, H. Ed.; Academic Press, **2010**, Vol. 64, 117-210.
49. Vollmer, A.; Voiges, K.; Bork, C.; Fiege, K.; Cuber, K.; Mischnick, P., *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 395, 1749-1768.
50. De Belder, A. N.; Norrman, B. *Carbohydr. Res.* **1969**, 10, 391-394.
51. Ravi Kumar, M. N. V., *React. Funct. Polym.* **2000**, 46, 1-27.
52. Weitz, J. I., *New Engl. J. Med.* **1997**, 337, 688-699.
53. Suda, Y.; Arano, A.; Fukui, Y.; Koshida, S.; Wakao, M.; Nishimura, T.; Kusumoto, S.; Sobel, M. *Bioconjugate Chem.* **2006**, 17, 1125-1135.
54. Sardzik, R.; Noble, G. T.; Weissenborn, M. J.; Martin, A.; Webb, S. J.; Flitsch, S. L. *Beilstein J. Org. Chem.* **2010**, 6, 699-703.
55. Berlin, P.; Klemm, D.; Tiller, J.; Rieseler, R. *Macromol. Chem. Phys* **2000**, 201, 2070-2082.
56. Gonera, A.; Mischnick, P.; Ukeda, H. *Enzyme Microb. Technol.* **2004**, 34, 248-254.
57. Mann, J. S.; Huang, J. C.; Keana, J. F. W. *Bioconjugate Chem.* **1992**, 3, 154-159.
58. Ademovic, Z.; Gonera, A.; Mischnick, P.; Klee, D. *Biomacromolecules* **2006**, 7, 1429-1432.
59. Höbel, S.; Loos, A.; Appelhans, D.; Schwarz, S.; Seidel, J.; Voit, B.; Aigner, A. *J. Controlled Release*, 149, 146-158.
60. Sisu, I.; Udrescu, V.; Flangea, C.; Tudor, S.; Dinca, N.; Rusnac, L.; Zamfir, A.; Sisu, E. *Cent. Eur. J. Chem.* **2009**, 7, 66-73.
61. Ren, J.; Liu, J.; Dong, F.; Guo, Z. *Carbohydr. Polym.* **2011**, 83, 1240-1244.
62. Nakamura, S.; Amano, M.; Saegusa, Y.; Sato, T. *J. Appl. Polym. Sci.* **1992**, 45, 265-271.
63. Verraest, D. L.; Da Silva, L. P.; Peters, J. A.; Van, B., H. *Starch - Stärke* **1996**, 48, 191-195.

64. Verraest, D. L.; Zitha-Bovens, E.; Peters, J. A.; Van Bekkum, H. *Carbohydr. Res.* **1998**, *310*, 109-115.
65. Onda, Y.; Muto, H.; Suzuki, H. Cyanoethylpullulan, U.S. patent 4,322,524, March 30, **1982**.
66. Yoshida, H.; Takei, F.; Sawatari, N. *FUJITSU Sci. Tech. J.* **2002**, *38*, 39-45.
67. Finkenstadt, V. L. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *67*, 735-745.
68. Yamaguchi, H.; Itoh, M.; Ishikawa, H.; Kusuda, K. *J. Macromol. Sci., Part A: Pure Appl. Chem.*, **1993**, *30 (A)*, 287-292.
69. Jagadish, R. S.; Divyashree, K. N.; Viswanath, P.; Srinivas, P.; Raj, B. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *87*, 110-116.
70. Friebolin, H. *Basic one- and two-dimensional NMR spectroscopy*, Vol. 4; Wiley-VCH: Weinheim, **2008**.
71. Sweet, D. P.; Shapiro, R. H.; Albersheim, P. *Carbohydr. Res.* **1975**, *40*, 217-225.
72. Jorgensen, A. D.; Picel, K. C.; Stamoudis, V. C. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 683-689.
73. Scanlon, J. T.; Willis, D. E. *J. Chromatogr. Sci.* **1985**, *23*, 333-340.
74. Spurlin, H. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1939**, *61*, 2222-2227.
75. Reuben, J. *Carbohydr. Res.* **1986**, *157*, 201-213.
76. Köhler, S.; Liebert, T.; Heinze, T.; Vollmer, A.; Mischnick, P.; Möllmann, E.; Becker, W. *Cellulose* **2010**, *17*, 437-448.
77. Arisz, P. W.; Kauw, H. J. J.; Boon, J. J. *Carbohydr. Res.* **1995**, *271*, 1-14.
78. Wolf, E. L. *Nanophysics and Nanotechnology: an introduction to modern concepts in nanoscience*; Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
79. Pradeep, T. *Nano: the essentials: understanding nanoscience, nanotechnology*; Tate McGraw-Hill: New York, **2008**.
80. Sepeur, S. *Nanotechnologie: Grundlagen und Anwendungen*; Vincentz Network: Hannover, **2008**.
81. Feynman, R. P., *Eng. Sci.* **1960**, *23:5*, 22-40.
82. Taniguchi, N., in *Proc. Int. Conf. Prod. Eng. Tokyo, Part II*, Japan Society of Precision Engineering, Tokyo, **1974**.
83. Pockels, A. *Science* **1926**, *64*, 304.
84. Empfehlung der Kommission vom 18. Oktober 2011 zur Definition von Nanomaterialien, (2011/696/EU), Amtsblatt der Europäischen Union, 20.10.2011.
85. ISO/TS 27687:2008 Nanotechnologies - Terminology and definitions for nano-objects - Nanoparticle, nanofibre and nanoplate; International Organization for Standardization.
86. Verordnung (EG) Nr. 178/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 28. Januar 2002 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit.
87. Verordnung (EG) Nr. 258/97 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 27. Januar 1997 über neuartige Lebensmittel und neuartige Lebensmittelzutaten.
88. Verordnung (EG) Nr. 1223/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 30. November 2009 über kosmetische Mittel, (Neufassung).
89. Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 18. Dezember 2006 zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH).
90. Sekhon, B. S. *Nanotechnol. Sci. Appl.* **2010**, *2010:3*, 1-15.
91. Weiss, J.; Takhistov, P.; McClements, D. J. *J. Food Sci.* **2006**, *71*, 107-116.
92. Woodrow Wilson International Center for Scholars, Inventory über Nano-Produkte; (<http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer>), July **2012**.
93. Aguilar-Arteaga, K.; Rodriguez, J. A.; Barrado, E. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *674*, 157-165.
94. Wang, X.; Liu L.-H.; Ramström, O.; Yan, M. *Exp. Biol. Med.* **2009**, *234*, 1128-1139.

95. Rongved, P.; Klaveness, J. *Carbohydr. Res.* **1991**, *214*, 315-323.
96. Saboktakin, M. R.; Tabatabaie R. M.; Maharramov, A.; Ramazanov, M. A. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *80*, 695-698.
97. Horák, D.; Babič, M.; Macková, H.; Beneš, M. J. *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 1751-1772.
98. Horák, D.; Rittich, B.; Spanová, A. *J. Magn. Magn. Mater.* **2007**, *311*, 249-254.
99. Jay, A. J. *Carbohydr. Chem.* **1996**, *15*(8), 897-923.
100. Mischnick, P.; Kühn, G. *Carbohydr. Res.* **1996**, *290*, 199-207.
101. Price, N. P. J. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2008**, *148*, 271-276.
102. Mischnick, P. *Cellulose* **2001**, *8*, 245-257.
103. Purdie, T.; Bridgett, R. C. *J. Chem. Soc.* **1903**, *83*, 1037-1041.
104. Haworth, W. N. *J. Chem. Soc.* **1915**, *107*, 8.
105. Kuhn, R.; Trischmann, H.; Löw, I. *Angew. Chem.* **1955**, *67*, 32.
106. Köhler, S.; Liebert, T.; Heinze, T. *J. Polym. Sci. Part A: Polymer Chemistry* **2008**, *46*, 4070-4080.
107. Matthews, W. S.; Bares, J. E.; Bartmess, J. E.; Bordwell, F. G.; Cornforth, F. J.; Drucker, G. E.; Margolin, Z.; McCallum, R. J.; McCollum, G. J.; Vanier, N. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 7006-7014.
108. Ciucanu, I.; Kerek, F. *Carbohydr. Res.* **1984**, *131*, 209-217.
109. Scheutjens, J. M. H. M.; Fleer, G. J. *J. of Phys. Chem.* **1980**, *84*, 178-190.
110. Heinze, T.; Koschella, A. *Macromol. Symp.* **2005**, *223*, 13-40.
111. Needs, P. W.; Selvendran, R. R. *Carbohydr. Res.* **1993**, *245*, 1-10.
112. York, W. S.; Kiefer, L. L.; Albersheim, P.; Darvill, A. G. *Carbohydr. Res.* **1990**, *208*, 175-182.
113. Ciucanu, I.; Costello, C. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 16213-16219.
114. Barker, S. A.; Law, A. R.; Somers, P. J.; Stacey, M. *Carbohydr. Res.* **1967**, *3*, 435-444.
115. Machell, G.; Richards, G. N. *J. Chem. Soc.* **1957**, 4500-4506.
116. Heinrich, J. *Strukturaufklärung von Cellulosederivaten und Galactanen mittels chemischer, chromatographischer und massenspektrometrischer Methoden*, Dissertation, Hamburg, **1999**.
117. Tahir, M. N.; Bork, C.; Risberg, A.; Horst, J. C.; Komoß, C.; Vollmer, A.; Mischnick, P. *Macromol. Chem. Phys.* **2010**, *211*, 1648-1662.
118. De Belder, A. N.; Norrman, B. *Carbohydr. Res.* **1969**, *10*, 391-394.
119. Ioan, C. E.; Aberle, T.; Burchard, W. *Macromolecules* **2001**, *34*, 326-336.
120. Burchard, V. W.; Pfannemüller, B., *Makromol. Chem.* **1969**, *121*, 18-32.
121. Fiege, K.; Lünsdorf, H.; Atarijazarzadeh, S.; Mischnick, P. *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 551-566.
122. Hebeish, A.; Khalil, M. I. *Starch - Stärke* **1988**, *40*, 104-107.
123. Miani, M.; Gianni, R.; Liut, G.; Rizzo, R.; Toffanin, R.; Delben, F. *Carbohydr. Polym.* **2004**, *55*, 163-169.
124. Volkert, B.; Wagenknecht, W.; Mai, M. Structure-Property Relationship of Cellulose ethers – Influence of the Synthetic Pathways on Cyanoethylation. In *Cellulose Solvents: For Analysis, Shaping and Chemical Modification*; American Chemical Society: Washington, DC, **2010**, Vol. 1033, 319-341.
125. Daly, W. H.; Munir, A. *J. Polym. Sci.: Polymer Chemistry Edition* **1984**, *22*, 975-984.
126. Verraest, D. L.; Peters, J. A.; Kuzee, H. C.; Raaijmakers, H. W. C.; Van Bekkum, H. *Carbohydr. Res.* **1997**, *302*, 203-212.
127. Gonera, A. *Aminofunctional Starch Derivatives: Synthesis, Analysis, and Application*, Dissertation, Cuvillier Verlag Göttingen, **2004**.
128. Gonera, A.; Goclik, V.; Baum, M.; Mischnick, P. *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 2263-2272.
129. Cuber, K. *Aminofunktionalisierung von Dextranen durch Reduktion eingeführter Cyanoethylgruppen*, Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Braunschweig, **2008**.
130. Zinow, H. *Darstellung und Charakterisierung von Cyano- und Aminoalkylpolysacchariden für das Coating von ferromagnetischen Nanopartikeln*, Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Braunschweig, **2008**.

131. Chatterjee, P. K.; Conrad, C. M. *J. Polym. Sci. Part A-1: Polymer Chemistry* **1966**, *4*, 233-243.
132. Piehler, J.; Brecht, A.; Geckeler, K. E.; Gauglitz, G., *Biosens. Bioelectron.* **1996**, *11*, 579-590.
133. Heinze, T.; Liebert, T.; Heublein, B.; Hornig, S. Functional Polymers Based on Dextran. In *Adv. Polym. Sci.*, Klemm D., Ed.; Springer: Berlin, Heidelberg, **2006**; Vol. 205; 199-291.
134. Fujita, F.; Fukami, K. Fujimoto, M. Pullulan Aminoalkyl Ether, *U.S. patent* *4,167,623*, *September 11*, **1979**.
135. Tahir, M. N.; Lämmerhardt, N.; Mischnick, P. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *88*, 154-164.
136. Brückner, R. *Reaktionsmechanismen: organische Reaktionen, Stereochemie, moderne Synthesemethoden*, 2th ed.; Spektrum akademischer Verlag: Heidelberg, Berlin, **2009**.
137. Heinzman, S. W.; Ganem, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 6801-6802.
138. Unterieser, I.; Mischnick, P. *Carbohydr. Res.* **2011**, *346*, 68-75.
139. Zhang, Y.; Huang, L.-J.; Wang, Z.-F. *Chin. J. Chem.* **2007**, *25*, 1522-1528.
140. Sun, Z.; Wei, Z.; Wei, K. *Lett. Org. Chem.* **2009**, *6*, 549-551.
141. Ruhaak, L. R.; Steenvoorden, E.; Koeleman, C. A. M.; Deelder, A. M.; Wuhler, M. *Proteomics* **2010**, *10*, 2330-2336.
142. Townsend, R. R.; Lipniunas, P. H.; Bigge, C. Ventom, A.; Parekh, R. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 200-207.
143. Sato, S.; Sakamoto, T.; Miyazawa, E.; Kikugawa, Y. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 7899-7906.
144. Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 6th ed.; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **2002**.
145. Yao, W.; Jiao, Y.; Luo, J.; Du, M.; Zong, L., *Int. J. Biol. Macromol.* **2012**, *50*, 821-825.
146. Hoffman, R. E.; Davies, D. B. *Magn. Reson. Chem.* **1988**, *26*, 425-429.
147. Baigude, H.; Katsuraya, K.; Okuyama, K.; Hatanaka, K.; Ikeda, E.; Shibata, N.; Uryu, T. *J. Polym. Sci., Part A-1: Polym. Chem.* **2004**, *42*, 1400-1414.
148. Appelhans, D.; Zhong, Y.; Komber, H.; Friedel, P.; Oertel, U.; Scheler, U.; Morgner, N.; Kuckling, D.; Richter, S.; Seidel, J.; Brutschy, B.; Voit, B., *Macromol. Biosci.* **2007**, *7*, 373-383.
149. Appelhans, D.; Komber, H.; Quadir, M. A.; Richter, S.; Schwarz, S.; Van der Vlist, J.; Aigner, A.; Müller, M.; Loos, K.; Seidel, J. r.; Arndt, K.-F.; Haag, R.; Voit, B., *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 1114-1124.
150. Riedel, E.; Janiak, C. *Anorganische Chemie*, Vol. 5; Walter de Gruyter: Berlin, New York, **2002**.
151. Gubin, S. P.; Kokosharov, Y. A.; Khomutov, G. B.; Yurkov, G. Y. *Russ. Chem. Rev.* **2005**, *72*, 489-520.
152. Pepperhoff, W.; Acet, M. *Constitution and Magnetism of iron and its alloys*; Springer, **2001**.
153. Kneller, E. F.; Luborsky, F. E. *J. Appl. Phys.* **1963**, *34*.
154. Dunlop, D. J.; Özdemir, Ö. *Rock magnetism*; Cambridge University Press: Cambridge, **1997**.
155. Vollath, D. *Nanomaterials: an introduction to synthesis, properties and application*; Wiley-VCH: Weinheim, **2008**.
156. Heim, E. *Fluxgate-Magnetrelaxometrie magnetischer Nanopartikel*, Dissertation, Braunschweig, **2009**.
157. Lu, A.-H.; Salabas, E. L.; Schüth, F. *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 1242-1266.
158. Xuan, S.; Hao, L.; Jiang, W.; Gong, X.; Hu, Y.; Chen, Z. *J. Magn. Magn. Mater.* **2007**, *308*, 210-213.
159. Ramírez, L. P.; Landfester, K., *Macromol. Chem. Phys.* **2003**, *204*, 22-31.
160. Liu, C.; Zou, B.; Rondinone, A. J.; Zhang, Z. J. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 1141-1145.
161. Landfester, K.; Bechthold, N.; Tiarks, F.; Antonietti, M. *Macromolecules* **1999**, *32*, 5222-5228.
162. Landfester, K. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 4488-4507.

163. Zhang, L.; He, R.; Gu, H.-C. *Mater. Res. Bull.* **2006**, *41*, 260-267.
164. Bilecka, I.; Djerdj, I.; Niederberger, M. *Chem. Commun.* **2008**, 886-888.
165. Likhitkar, S.; Bajpai, A. K. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *87*, 300-308.
166. Schwertmann, U.; Cornell, R. M. *Iron oxides in the laboratory: preparation and characterization*; VCH Verlagsgesellschaft: Weinheim, **1991**.
167. Dias, A. M. G. C.; Hussain, A.; Marcos, A. S.; Roque, A. C. A., *Biotechnol. Adv.* **2011**, *29*, 142-155.
168. Tiede, K.; Boxall, A. B. A.; Tear, S. P.; Lewis, J.; David, H.; Hassellöv, M. *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment* **2008**, *25*, 795-821.
169. Blasco, C.; Picó, Y. *Trends in Analytical Chemistry* **2011**, *30*, 84-99.
170. Luykx, D. M. A. M.; Peters, R. J. B.; Van Ruth, S. M.; Bouwmeester, H. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 8231-8247.
171. Schärtl, W. *Light scattering from polymer solutions and nanoparticle dispersions*; Vol. 1.; Springer Verlag: Berlin, Heidelberg, **2010**.
172. Lechner, M. D.; Gehrke, K.; Nordmeier, E. H. *Makromolekulare Chemie.*, Vol. 3.; Birkhäuser: Basel, **2003**.
173. Berne, B. J.; Pecora, R. *Dynamic light scattering*; Wiley: New York, **1976**.
174. Flegler, S. L.; Heckman, J. W.; Klomparens, K. L. *Elektronenmikroskopie: Grundlagen, Methoden, Anwendungen*; Spektrum akademischer Verlag, **1995**.
175. Wang, Z. L. *Characterization of Nanophase Materials*; Wiley-VCH: Weinheim, **2000**.
176. Egerton, R. F. *Electron Energy-Loss-Spectroscopy in the Electron Microscope*, 2th ed.; Plenum Press: New York, London, **1996**.
177. Reimer, L.; Zepke, U.; Moesch, J.; Schulze-Hillert, S.; Ross-Messemer, M.; Probst, W.; Weimer, E. *EEL Spectroscopy, A reference Handbook of Standard Data for Generation of Electron Spectroscopic Images*; Institute of Physics: University of Münster, Germany, and Carl Zeiss, Electron Optics Division: Oberkochen, Ger-many, **1992**.
178. Berkowitz, A. E.; Schuele, W. J.; Flanders, P. J. *J. Appl. Phys.* **1968**, *39*, 1261-1263.
179. Ludwig, F.; Heim, E.; Schilling, M. *J. Appl. Phys.* **2007**, *101*.
180. Ludwig, F.; Heim, E.; Schilling, M.; Enpuku, K. *J. Appl. Phys.* **2008**, *103*.
181. Hergt, R.; Dutz, S.; Zeisberger, M. *Nanotechnology* **2010**, *21*, 015706.
182. Biederer, S.; Knopp, T.; Sattel, T. F.; Lüdtke-Buzug, K.; Gleich, B.; Weizenecker, J.; Borgert, J. Buzug, T.M. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2009**, *42*, 205007.
183. Massart, R. *Magnetics, IEEE Trans. Magn.* **1981**, *17*, 1247-1248.
184. Dutz, S.; Clement, J. H.; Eberbeck, D.; Gelbrich, T.; Hergt, R.; Müller, R.; Wotschadlo, J.; Zeisberger, M. *J. Magn. Magn. Mater.* **2009**, *321*, 1501-1504.
185. Khalafalla, S.; Reimers, G. *Magnetics, IEEE Trans. Magn.* **1980**, *16*, 178-183.
186. Salazar, J. S.; Perez, L.; De Abril, O.; Phuoc, L. T.; Ihiwakrim, D.; Vazquez, M.; Greneche, J.-M.; Begin-Colin, S.; Pourroy, G. *Chem. Mater.* **2011**, *23*, 1379-1386.
187. Galindo-Rodriguez, S.; Allémann, E.; Fessi, H.; Doelker, E., *Pharm. Res.* **2004**, *21*, 1428-1439.
188. Halley, J. D.; Winkler, D. A. *Complexity* **2008**, *14*, 10-17.
189. Hornig, S.; Heinze, T. *Carbohydr. Polym.* **2007**, *68*, 280-286.
190. Hornig, S.; Heinze, T. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 1487-1492.
191. Hornig, S.; Heinze, T.; Becer, C. R.; Schubert, U. S. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 3838-3840.
192. Wotschadlo, J.; Liebert, T.; Heinze, T.; Wagner, K.; Schnabelrauch, M.; Dutz, S.; Müller, R.; Steiniger, F.; Schwalbe, M.; Kroll, T. C.; Höffken, K.; Buske, N.; Clement, J. H. *J. Magn. Magn. Mater.* **2009**, *321*, 1469-1473.
193. Liebert, T.; Hornig, S.; Hesse, S.; Heinze, T. *Macromol. Symp.* **2005**, *223*, 253-266.
194. Van Aken, P. A.; Liebscher, B.; Styrsa, V. J. *Phys. Chem. Minerals* **1998**, *25*, 323-327.

195. Cressey, G.; Henderson, C. M. B.; Van der Laan, G. *Phys. Chem. Minerals* **1993**, *20*, 111-119.
196. Garvie, L. A. J.; Craven, A. J.; Brydson, R. *Am. Mineral.* **1994**, *79*, 411-425.
197. Hong, X.; Guo, W.; Yuan, H.; Li, J.; Liu, Y.; Ma, L.; Bai, Y.; Li, T. *J. Magn. Magn. Mater.* **2004**, *269*, 95-100.
198. Hornig, S.; Bunjes, H. and Heinze, T., *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, *338*, 56-62.
199. Bhui, D. K.; Pyne, S.; Sarkar, P.; Bar, H.; Sahoo, G. P.; Misra, A. *J. Mol. Liq.* **2011**, *158*, 170-174.
200. Vollhardt, K. P. C.; Schore, N. E. *Organische Chemie*, 3 ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, **2000**.
201. Nikolajski, M.; Wotschadlo, J.; Clement, J. H.; Heinze, T., *Macromol. Biosci.* **2012**, *12*, 920-925.
202. Weigele, M.; DeBernardo, S. L.; Teng, J. P.; Leimgruber, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 5927-5928.
203. Pippig, F.; Holländer, A. *Appl. Surf. Sci.* **2007**, *253*, 6817-6823.
204. Hedrich, S.; Lünsdorf, H.; Kleeberg, R.; Heide, G.; Seifert, J.; Schlömann, M. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45*, 7685-7692.